

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata**

“Caracterización mutacional y funcional de las proteínas de movimiento de ophiovirus”

Lic. María Belén Borniego

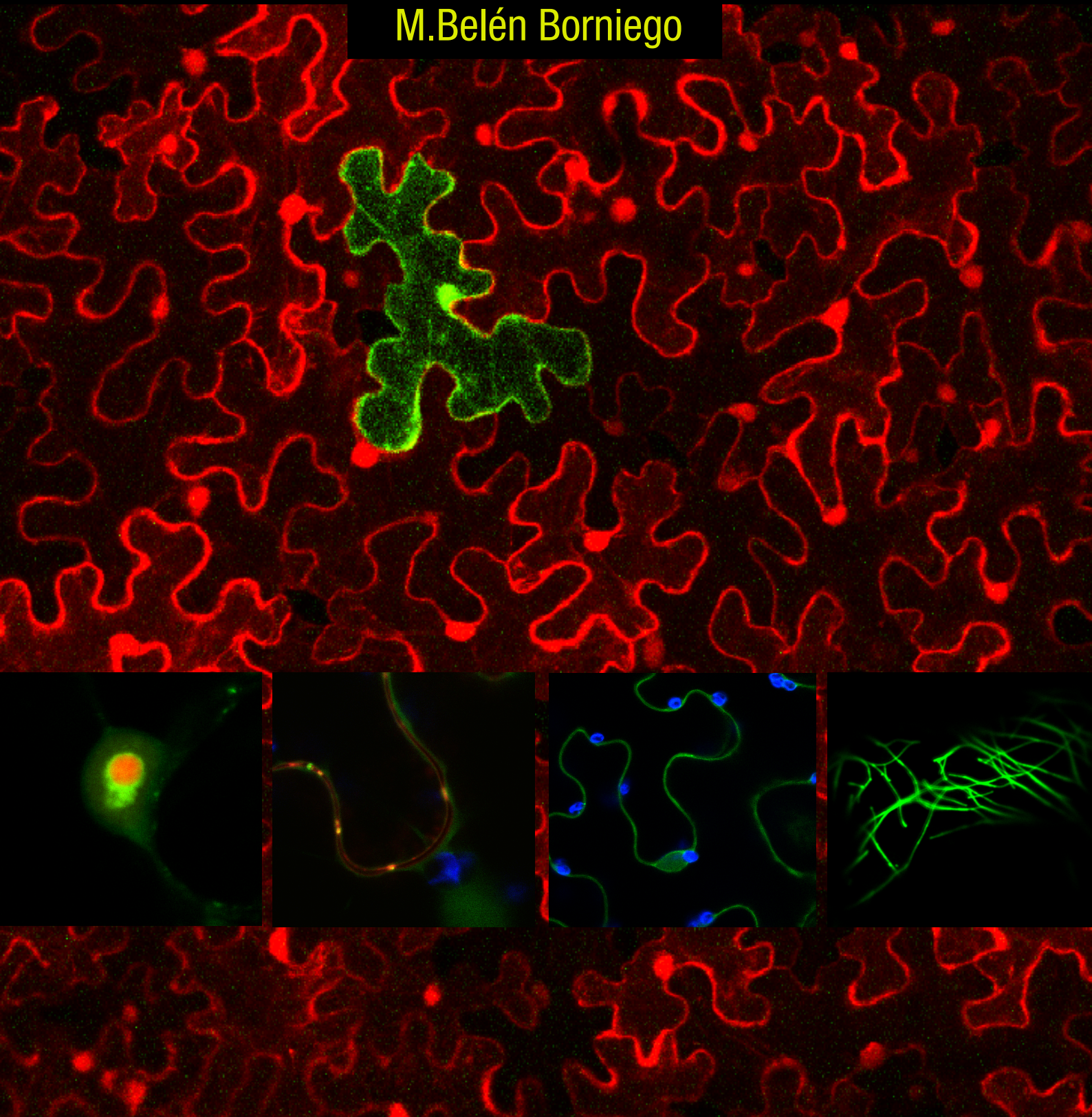
Director: Dra. María Laura García

Junio 2017

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN MUTACIONAL Y FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO DE OPHIOVIRUS

M.Belén Borniego



El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CCT-La Plata-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Laura García.

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por posibilitarme realizar el doctorado dentro del ámbito de la Institución.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas.

Mi agradecimiento,

A todos los integrantes de este hermoso equipo de Virus Vegetales:

A mi directora, la Dra. María Laura García, por brindarme su confianza y apoyo en cada paso de este proyecto. Por sus consejos y dedicación en la corrección de la tesis. Por alentarme a confiar en mí. Gracias Laura, ha sido un placer realizar este trabajo bajo tu dirección.

A mis coequiper de 'movimiento': a Gabo, por su permanente apoyo desde mi primer día en el lab. Por su criterio y disposición para planear experimentos. Por motivarme a seguir adelante y no rendirme nunca. Por su enorme generosidad. Gracias por enseñarme tanto, desde el 'digerido/sin digerir' hasta las largas jornadas de confocal compartidas. He disfrutado un montón tu compañía, tus locuras, tus asados y chocolates. A Edu, por ser el alma del equipo, por ponerle tantas ganas y buen humor a la ciencia. Por transmitirme gran parte de su conocimiento y experiencia. Gracias por tu desinteresada ayuda y por tu aporte cuando más lo necesité. Ha sido muy divertido compartir estos años de lab con vos.

A las chicas: A Cari, por estar siempre atenta a ayudarme a superar cada obstáculo que aparecía. Por sus consejos académicos y personales, que me ayudaron a crecer y ganar confianza para seguir. Por escucharme y guiarme siempre a tomar las mejores decisiones. Gracias por todos los momentos compartidos y por disfrutar juntas de las anécdotas de tu hermosa Azu y mi bello Agus. Ha sido hermoso transcurrir estos años de doctorado 'contigo'. A Agus, por recibirme de manera tan cálida y amable mis primeros días en el lab. Por su paciencia para enseñarme a cuidar de las benthamianas durante largas horas en el 'benthamianario'. Por su gran empatía y disposición para aconsejarme cada vez que lo necesité. Por alentarme a no tenerle miedo al cambio. Gracias por hacer más amenas las jornadas de lab y oficina. A Eli, por ayudarme en mis comienzos y por tener siempre la palabra justa. Por ser tan buena compañera y enseñarme a dejar de lado el estrés y disfrutar de la ciencia. Por incentivarme a elegir el camino

correcto en mi carrera. Por todas las horas de pipeteo y charlas compartidas. Gracias por rescatarme siempre, desde el subte los días de CAV, hasta del pogo en el recital de Aerosmith. A Lu, porque desde su primer día en el lab, me demostró ser la mejor compañera de doctorado que podría tener. Porque transitamos juntas este hermoso y desafiante camino por la ciencia. Por entenderme siempre y estar al pie del cañón cada vez que necesité de sus palabras y consejos. Gracias por estos hermosos y divertidos años como tesisistas compartidos, y por tus exquisitos platos gourmet. Ha sido tremendamente disfrutable cada risa compartida estos años.

A los más peques: a Facu, por ser el 'MacGyver' del equipo. Por su gran compañerismo. Por ayudarme a poner orden en el lab. Por tener siempre una solución a mis problemas técnicos. Por estar más que dispuesto a colaborar con lo que necesite. Por todos los viajes al inver cargando mis cientos de plantas. Gracias por todas las charlas de mesada y por hacer más divertidos mis pipeteos con tus ocurrencias. A Mati, que con su exuberante humor logró ponerle mucha diversión al lab. Por acompañarme y compartir mis obsesiones de orden de mesada. Por todas las divertidas y originales charlas de lab. Gracias por tus consejos y aguante en este tramo final. A Romi, por haber hecho tan sencilla mi tarea como su tutora. Por los lindos momentos como compañeras compartidos. Por haberme contagiado su amor por el gim. Gracias por alimentarme siempre con tus riquísimas tortas sin TACC.

A todos mis compañeros del instituto:

A los chicos de Virus Animales, por tener siempre un sí como respuesta cuando necesité de ellos. A Leti, por todo su asesoramiento bioinformático, fundamental en la escritura de la tesis. A Mati y Santi, por compartirme sus truquitos de clonado y competentes. A Emi, por estar siempre disponible a ayudarme con el microscopio.

Al divertido grupo de R3, por tener siempre un lugarcito disponible en el shaker para mis cultivos.

A los R4, por prestarme siempre el espectro para todas mis medidas de DO.

A los RPS, por nunca negarme el nanodrop.

A los CPAs, por su más que valorable soporte técnico en todas las tareas del lab.

A mis amigas de la facu: A Jesi, porque fue la responsable de mi ingreso en el grupo de Laura. A Lau, por su invaluable ayuda y asesoramiento en esta etapa final de doctorado. A Fer, Belu y Pau por todas las charlas compartidas. Gracias a todas por bancar y compartir mi 'ñoñez' en cada viaje y salida, y por ser tantas veces mi escape del estrés laboral.

Por último y más importante de todo, a mi hermosa familia: por ser mi sostén diario pese a la distancia. Por acompañarme y guiarme en cada pasito que fui dando en estos años de tesis. Por el amor incondicional. A mi Lu, por ser mi cómplice y compañera de vida, por tantos consejos y aguante a lo largo de toda esta etapa. Gracias hermana, sin tu apoyo incondicional no lo hubiese logrado, te adoro!!!

Índice

ABREVIATURAS.....	9
ACRÓNIMOS VIRALES.....	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	13
1. Virus de plantas: el enemigo invisible.....	15
1.1. El descubrimiento del Virus del Mosaico del Tabaco: los inicios de la virología vegetal	16
1.2. Interacción de los virus con sus hospedantes	18
1.3. Biodiversidad viral	19
2. Los ophiovirus.....	19
2.1. La psorosis de los cítricos.....	22
2.2. El “ <i>Big-vein</i> ” de lechuga	25
2.3. El genoma de Mirafiori lettuce big-vein virus.....	27
3. Movimiento viral.....	28
3.1. Plasmodesmos: las puertas de la comunicación simplástica.....	29
3.2. Movimiento viral intracelular: ‘ <i>Plasmodesmata targeting</i> ’	33
3.3. Movimiento viral intercelular.....	36
HIPÓTESIS GENERALES	45
OBJETIVOS GENERALES	47
CAPÍTULO 1	49
INTRODUCCIÓN.....	51
1. La superfamilia 30K	51
2. Estudio de la función génica en virus a RNA negativos.....	52
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	53
RESULTADOS	55
1. Construcción de un nuevo vector viral basado en TMV compatible con la agroinfiltración para el estudio del movimiento viral célula a célula y optimización del ensayo de infección.....	55
2. Análisis bioinformático de las MP de los ophiovirus	58
3. Análisis funcional del ácido aspártico conservado dentro de la superfamilia 30K.....	61
CONCLUSIONES.....	67
DISCUSIÓN.....	69
PERSPECTIVAS.....	73
CAPÍTULO 2	75
INTRODUCCIÓN.....	77
1. Bioinformática de proteínas aplicada a la virología.....	77
2. Localización subcelular y dominios funcionales de la MP 30K de TMV	77

3. Localización subcelular y funciones asociadas de la MP 30K de CPsV	79
HIPÓTESIS.....	81
OBJETIVOS.....	81
RESULTADOS	83
1. Estudio bioinformático de la MP de CPsV.....	83
2. Diseño y generación de versiones mutadas de la MP de CPsV	88
3. Estudio funcional de los mutantes de MP ^{CPsV}	90
CONCLUSIONES	103
DISCUSIÓN	105
PERSPECTIVAS	109
CAPÍTULO 3.....	111
INTRODUCCIÓN.....	113
1. La proteína 24K de CPsV.....	113
2. Silenciamiento antiviral de RNA	114
3. Supresión del silenciamiento de RNA mediada por virus	115
4. Rol del nucléolo y otras estructuras sub-nucleares en la infección viral	116
HIPÓTESIS.....	123
OBJETIVOS.....	123
RESULTADOS	125
1. Análisis bioinformático de la proteína 24K de CPsV	125
2. Diseño y generación de mutantes de la proteína 24K de CPsV	130
3. Análisis funcional de la proteína 24K y sus versiones mutadas.....	131
CONCLUSIONES	139
DISCUSIÓN	141
PERSPECTIVAS	145
CAPÍTULO 4.....	147
INTRODUCCIÓN.....	149
1. Transporte viral por el floema.....	149
2. Estudio del movimiento a larga distancia en virus a RNA negativos	155
3. Cucumber mosaic virus (CMV) como modelo para el estudio del movimiento viral	156
HIPÓTESIS.....	159
OBJETIVOS.....	159
RESULTADOS	161
1. Estudio del movimiento sistémico de un virus híbrido CMV-CPsV	161
2. Análisis de la capacidad de complementar en <i>trans</i> el movimiento a larga distancia de virus positivos defectivos usando líneas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> que expresan las proteínas MP y CP de CPsV	169
CONCLUSIONES	175
DISCUSIÓN	177

PERSPECTIVAS	179
CAPÍTULO 5	181
INTRODUCCIÓN.....	183
1. Factores celulares involucrados en la infección viral	183
2. Proteínas del hospedante que interactúan con las MP virales.....	183
3. Técnicas de proteómica aplicadas a la identificación de proteínas que participan de la interacción planta-virus.....	192
HIPÓTESIS	195
OBJETIVOS	195
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	197
1. Aislamiento de proteínas de <i>N. benthamiana</i> que interactúan con MPC ^{PSV}	197
2. Análisis por SDS-PAGE de los sedimentos obtenidos en los ensayos de Co-IP	198
3. Análisis por espectrometría de masas (Orbitrap).....	199
4. Análisis de las funciones de las proteínas celulares que coimmunoprecipitan con la MPC ^{PSV}	203
CONCLUSIONES.....	209
PERSPECTIVAS	211
CONCLUSIONES GENERALES.....	213
MATERIALES Y MÉTODOS	217
1. Materiales	219
1.1. Reactivos químicos	219
1.2. Cepas bacterianas	219
1.3. Vectores de clonado	219
1.4. Plásmidos binarios	219
1.5. Vectores virales.....	220
1.6. Cebadores.....	220
1.7. Sueros.....	221
1.8. Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento	221
1.9. Secuencias de las proteínas virales de ophiovirus que se utilizaron en los análisis bioinformáticos	222
2. Métodos	224
2.1. Minipreparación de DNA plasmídico	224
2.2. Extracción de RNA de tejido vegetal.....	224
2.3. Reacción de transcripción reversa (RT).....	224
2.4. Reacción de PCR a tiempo final	225
2.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	225
2.6. Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes	225
2.7. Colony-PCR	226
2.8. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i>	226
2.9. Extracción de proteínas de tejido vegetal	226
2.10. Electroforesis en geles de poli(acrilamida) desnaturalizantes (SDS-PAGE)	227

2.11.	Análisis de proteínas por <i>Western blot</i>	227
2.12.	Tinción de geles de poliacrilamida con plata	228
2.13.	Co-inmunoprecipitación: GFP-Trap	228
2.14.	Análisis proteómico por espectrometría de masas	228
2.15.	Construcción de mutantes de las proteínas de ophiovirus	231
2.16.	Construcción del vector TMV Δ MP Δ CP-GFP para el estudio del movimiento viral célula a célula	231
2.17.	Construcción de la quimera RNA3 ^{CMV} Δ MP::MP ^{CPsV} para el estudio del movimiento a larga distancia	232
2.18.	Ensayos de <i>gating</i> de plasmodesmos	232
2.19.	Ensayos de transcomplementación del movimiento viral célula a célula de TMV Δ MP Δ CP-GFP	233
2.20.	Ensayos de transcomplementación del movimiento viral célula a célula de CMV Δ MP:GFP	233
2.21.	Ensayos de movimiento viral a larga distancia usando CMV	233
2.22.	Ensayos de movimiento viral a larga distancia usando TMV Δ CP:GFP	234
2.23.	Microscopía de fluorescencia	234
2.24.	Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de ophiovirus	234
BIBLIOGRAFÍA		237
ANEXO 1		273

ABREVIATURAS

AGO: Argonauta	NoLS: <i>Nucleolar localization signal</i>
Avr: <i>Avirulence factor</i>	NSm: <i>Non Structural medium</i>
cDNA: ADN complementario	ORF: <i>open reading frame</i>
CFP: <i>Cyan fluorescent protein</i>	P-bodies: <i>Processing bodies</i>
CP: Proteína de cubierta viral	PD: <i>Plasmodesmata</i>
CLSM: <i>Confocal laser scanning microscopy</i>	PDL1: <i>plasmodesmata located protein</i>
cTP: <i>Chloroplast transit peptide</i>	PDCB1: <i>Plasmodesmata callose binding proteins</i>
CW : <i>cell wall</i>	PTGS: <i>post transcriptional gene silencing</i>
D-bodies: <i>Dicing bodies</i>	R: Producto del gen <i>r</i> (resistencia)
DCL: <i>Dicer like</i>	RdRp: <i>RNA dependent RNA polimerase</i>
DO: Densidad óptica	RFP: <i>Red fluorescent protein</i>
Dpai: Días post agronifiltración	RISC: <i>RNA induced silencing complex</i>
Dpi: Días post inoculación	RNP: ribonucleoproteína
dsDNA: <i>double-strand DNA</i>	RT: Transcripción reversa
dsRNA: <i>double-strand RNA</i>	SAR: <i>Systemic aquired resistance</i>
FLIM: <i>Fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>	SEL: <i>size exclusion limit</i>
FRET: <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>	siRNA: <i>small interference RNA</i>
GFP: <i>Green fluorescent protein</i>	ssRNA: <i>single strand RNA</i>
HR: <i>hypersensitive response</i>	TGB: <i>Triple gene box</i>
kDa: <i>kilo Dalton</i>	TGS: <i>Transcriptional gene silencing</i>
mRNA: ARN mensajero	VIGS: <i>Virus induced gene silencing</i>
miRNA: <i>micro RNAs</i>	vRNPs: <i>viral ribonucleoproteins</i>
MP: <i>Movement protein</i>	VRCs: <i>Viral replication complexes</i>
MT: microtúbulos	VSRs: <i>Viral suppressor of RNA silencing protein</i>
NCAPs: <i>Non cell autonomous protein</i>	WT: <i>wild-type</i>
NLS: <i>Nuclear localization signal</i>	

ACRÓNIMOS VIRALES

AbMV: Abutilon mosaic virus	PLPV: Pelargonium line pattern virus
ACMV: African cassava mosaic virus	PLRV: Potato Leaf Roll Virus
ADV: Alfalfa dwarf virus	PMTV: Potato mop-top virus
AltMV: Alternanthera mosaic virus	PPV: Plum pox virus
AMV: Alfalfa mosaic virus	PSbMV: Pea seed-borne mosaic virus
BCTV: Beet curly top virus	PSLV: Poa semilatifolia virus
BGMV: Bean golden mosaic virus	PVX: Potato virus X
BIMaV: Blueberry mosaic associated virus	PVY : Potato virus Y
BMV: Brome mosaic virus	RCNMV: Red clover necrotic mosaic virus
BSMV: Barley stripe mosaic virus	RHBV: Rice hoja blanca virus
BYV: Beet yellow virus	RLBV: Raspberry leaf blotch virus
CaLCuV: Cabbage leaf curl virus	RSV: Rice stripe virus
CaMV: Cauliflower mosaic virus	RWMV: Ranunculus white mottle virus
CMV: Cucumber mosaic virus	SMV: Soybean mosaic virus
CMotV: Carrot mottle virus	SYNV: Sonchus yellow net virus
CPMV: Cowpea mosaic virus	SYSV: Shallot yellow stripe virus
CPsV: Citrus psorosis virus	TBSV: Tomato bushy stunt virus
CTV: Citrus tristeza virus	TBV: Tulip breaking virus
CymRSV: Cymbidium ringspot virus	TBRV: Tulip breaking virus
EBV: Epstein-Barr virus	TCrLYV: Tomato crinkle leaf yellows virus
FreSV: Fressia sneak virus	TCV: Turnip crinkle virus
GFLV: Grapevine fanleaf virus	TEV: Tobacco etch virus
GRV: Groundnut rosette virus	TGMV: Tomato golden mosaic virus
JEV: Japanese encephalitis virus	TLCV: Tobacco leaf curl virus
LBVaV: Lettuce big-vein associated virus	TMMMV: Tulip mild mottle mosaic virus
LMV: Lettuce mosaic virus	TMV: Tobacco mosaic virus
LNyV: Lettuce necrotic yellows virus	ToLCV: Tomato leaf curl virus
LRNV: Lettuce ring necrosis virus	ToMV: Tomato mosaic virus
MiLBVV: Mirafiori lettuce big-vein virus	TSWV: Tomato spotted wilt virus
MSV: Maize streak virus	TuMV: Turnip mosaic virus
OuMV: Ourmia melon virus	TVCV: Turnip vein clearing virus
OYDV: Onion yellow dwarf virus	

RESUMEN

Las plagas de los cultivos son una gran amenaza para la producción agrícola, en particular, las enfermedades virales son responsables de importantes pérdidas económicas en la producción de cultivos de importancia mundial.

Los ophiovirus son virus de plantas causantes de importantes enfermedades en cultivos de cítricos, lechuga, arándanos y plantas ornamentales. La psorosis de los cítricos es una enfermedad viral causada por el ophiovirus Citrus psorosis virus (CPsV), que produce un deterioro progresivo de los árboles al afectar sus tejidos conductores. Hasta el momento, no se conocen cultivares resistentes a CPsV. La enfermedad se ha reportado en muchas regiones productoras de cítricos a lo largo de todo el mundo. En nuestro país, se disemina de manera natural, reduciendo la producción de cítricos. La situación de la citricultura en todos los países de nuestra región se encuentra en expansión y constituye una actividad de muy alta importancia económica en la mayoría de éstos, con especial impacto en sus economías.

El *Big-vein* de lechuga es otra enfermedad importante causada por ophiovirus que afecta a las principales áreas de producción de lechuga en nuestra región. El agente etiológico es el ophiovirus Mirafiori lettuce big vein virus (MiLBVV), el cual es transmitido por zoosporas móviles del hongo *Olpidium virulentus*. El *big-vein* causa serios problemas en los cultivos de lechuga durante los períodos más fríos del año y afecta a todos los tipos de lechuga que crecen en suelo al aire libre o bajo cubierta, y a los cultivos hidropónicos. La importancia económica de la enfermedad se debe a los síntomas del follaje, que reducen el valor de mercado, y a los retrasos en la formación de la cabeza y la disminución del tamaño de la planta, que reduce la proporción de plantas cosechables, ya que estas plantas suelen ser descartadas en el momento de la cosecha.

Los cultivos de arándanos y variedades ornamentales como tulipán, fresia y ranúnculo también se encuentran afectados por ophiovirus.

Debido a las pérdidas económicas ocasionadas por los ophiovirus, resulta de interés comprender el proceso infectivo responsable de las enfermedades causadas por estos virus para el diseño de nuevas estrategias que ayuden a controlar su diseminación.

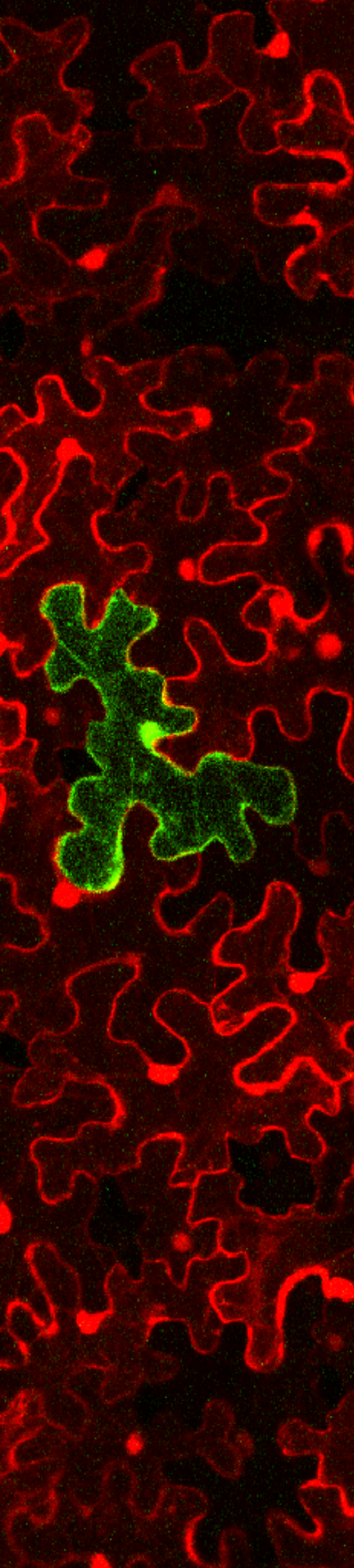
En este trabajo de tesis, se realizó un análisis exhaustivo de la secuencia y la predicción de estructura secundaria, junto con estudios funcionales sobre las MPs de esta familia de virus segmentados negativos. Se encontró que la MP de los ophiovirus es un miembro aislado de la superfamilia 30K, con una organización estructural única. En los ophiovirus, el ácido aspártico conservado dentro de este dominio es necesario para aumentar el tamaño límite de exclusión molecular de los plasmodesmos, para mantener su capacidad NCAP y para dirigir el

movimiento célula a célula de un vector viral de TMV deficiente en tal movimiento. Además, hemos logrado identificar otros posibles dominios y motivos funcionales presentes en la MP de CPsV, involucrados tanto en su localización subcelular como en su actividad como proteína de movimiento viral. Así, se encontró una NLS_BP funcional entre los aminoácidos 255 y 271, y la presencia de una posible señal de localización en plasmodesmos y de un péptido de tránsito a cloroplastos, ambos presentes en la región amino terminal de la MP. Encontramos que la región C-terminal es necesaria para que la proteína conserve la actividad proteasa, sin embargo, no sería necesaria para la función de movimiento célula a célula de la MP.

Los ensayos de movimiento sistémico con virus híbridos, nos permitieron mostrar las primeras evidencias que afirman la idea de que el transporte sistémico de los ophiovirus estaría regulado por sus MP.

Por ensayos de coimmunoprecipitación, hemos logrado identificar un número importante de proteínas de la planta que estarían interaccionando con la MP de CPsV. Por búsqueda bibliográfica, se encontró que un alto porcentaje de éstas participan en el transporte celular de macromoléculas y en las distintas etapas de expresión génica. También se identificaron una cantidad significativa de chaperonas, de proteínas asociadas con la respuesta frente a patógenos y hormonas, y de proteínas del sistema ubiquitina-proteasoma.

Por último, se confirmó la localización de la proteína 24K en nucléolo, Cajal bodies, microtúbulos y posiblemente *D-bodies*. Por medio de un análisis bioinformático, seguido del correspondiente análisis mutacional, se encontró la presencia de una posible señal de exportación nuclear que sería requerida para la correcta localización nucleolar de la proteína. Además, se encontró un posible motivo WG/GW de unión a la proteína argonauta que sería necesario para la localización de 24K en *D-bodies*. La región carboxilo terminal sería requerida para la acumulación de la proteína en nucléolo, mientras que la región amino terminal estaría involucrada en la acumulación de la proteína en agregados en nucleoplasma.



INTRODUCCIÓN GENERAL

'In essence, if PDs are the doorway out of the cell, then plant viruses must possess the tools to find the door as well as the keys to unlock the door.' (Schoelz et al., 2011).

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Virus de plantas: el enemigo invisible

Los virus son parásitos intracelulares obligados que sólo pueden multiplicar sus pequeños genomas en los organismos hospedantes. Por lo tanto, son exclusivamente dependientes del metabolismo celular del hospedante para su multiplicación y movimiento. La mayoría de los virus de plantas tienen genoma a DNA o RNA de cadena simple y positiva, y se transmiten mediante vectores biológicos o de manera mecánica. En particular, los genomas de los virus a RNA son generalmente más pequeños que los genomas de los virus a DNA, y por lo tanto, son aún más dependientes de su célula hospedante.

Entre los principales grupos de patógenos de plantas, los virus son los únicos que viven exclusivamente en el simplasto de sus hospedantes. Otra característica distintiva es su pequeño genoma. Un virus debe lograr la infección de su hospedante utilizando una cantidad muy limitada de material genético, por lo que se valen de la maquinaria intracelular del hospedante para su replicación e infección. Así, cualquier gen presente en un genoma viral, luego de generaciones de selección, debe tener una función o funciones esenciales en el ciclo viral.

Las infecciones virales generalmente causan síntomas que dan lugar a alteraciones morfológicas y fisiológicas de las plantas hospedantes que reducen su rendimiento, por ejemplo, reduciendo su biomasa y ocasionando pérdidas en los cultivos, como también pueden tener cierto atractivo en ornamentales (Figura 1A) y hasta presentar curiosos patrones en hoja (Figura 1B). Estos síntomas pueden ser muy variados, pero también, aunque presentes, los virus pueden no causar aparente sintomatología o incluso pueden ser completamente asintomáticos.

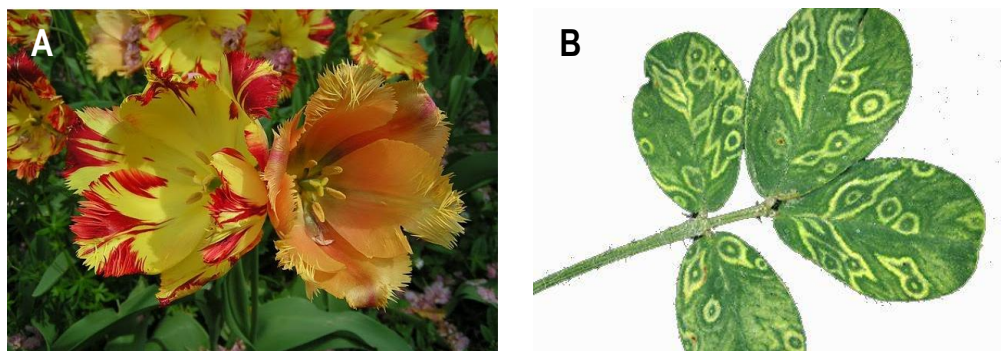


Figura 1. A) Planta de Tulipa Fringed 'Lambada' sana (derecha) e infectada con *Tulip breaking virus* (TBV) (izquierda). B) Hoja de planta de maní con manchas en anillos concéntricos causadas por el virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

1.1. El descubrimiento del Virus del Mosaico del Tabaco: los inicios de la virología vegetal

Los inicios de la virología vegetal se remontan a finales del siglo XIX. Para apreciar el descubrimiento de los virus como nuevos agentes infecciosos en aquella época, debemos pensar en contexto de lo que se sabía sobre la etiología de las enfermedades. Las bacterias eran reconocidas como los agentes causantes de la mayoría de las enfermedades infecciosas de plantas y animales. Se suponía que las bacterias u otros microorganismos serían responsables de todas las enfermedades transmisibles. La filtración era la principal técnica utilizada para separar tales agentes infecciosos de extractos o exudados, y se consideraba que la mayoría de los organismos infecciosos no pasaría a través de un filtro de porcelana sin esmaltar. El dogma del momento estaba basado en los postulados de Koch, que describían en detalle los pasos esenciales para determinar el organismo causal de una enfermedad: 1) el organismo debe estar asociado con la enfermedad y sus síntomas; 2) el organismo debe ser aislado y obtenido en cultivo puro; 3) la inoculación del organismo desde el cultivo puro debe reproducir la enfermedad; y 4) el organismo debe ser recuperado una vez más de las lesiones del hospedante. Además, los microbiólogos y los patólogos de ese entonces, creían que cada enfermedad infecciosa estaría identificada por un microorganismo que podría ser observado con el microscopio.

El descubrimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*) comienza con el químico agrícola Adolf Mayer en 1879, cuando decidió estudiar una peculiar enfermedad del tabaco. Aunque la enfermedad ya se conocía desde mediados del siglo XIX, se considera que él fue la primera persona que logró transmitir el virus utilizando como inóculo el extracto de una planta enferma. Mayer, hizo experimentos con papel de filtro y encontró que el agente pasaba inicialmente, pero tras una filtración repetida, el extracto no era infeccioso, por lo que concluyó que el agente causal era una bacteria. Descartó a los hongos, ya que consideraba que no pasarían ni siquiera la primera filtración con papel.

Si bien Mayer fue el pionero en el estudio de la enfermedad, el hombre que más crédito ha recibido por el descubrimiento de la naturaleza del agente infeccioso fue el botánico ruso Dmitrii Iwanowski. En 1887, Iwanowski comenzó a investigar esta enfermedad, que se manifestaba por la formación de un extraño diseño con forma de mosaico sobre las hojas (Figura 2) y a la que se refirió como “*wildfire*”, por la rapidez con la que se desarrollaba. Iwanowski sumergió hojas infectadas en un líquido para que se ablanden y del cual obtuvo un extracto



Figura 2. Planta de tabaco infectada con *tobacco mosaic virus* (TMV).

que hizo pasar a través de un filtro muy fino. Se encontró con que el líquido que pasaba a través del filtro podía infectar a las plantas sanas. Luego de varios intentos sin éxito de cultivar del agente infeccioso, llegó a la conclusión de que el agente causal era una bacteria incultivable capaz de atravesar los poros de los filtros. En 1892 presentó un artículo con sus descubrimientos en la Academia de Ciencias de San Petersburgo

Seis años más tarde, el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck introdujo por primera vez el concepto de virus. Concluyó que la enfermedad estaba producida por un nuevo tipo de agente infeccioso que denominó *Contagium Vivum Fluidum* (germen vivo soluble), sustancialmente distinto a las bacterias debido a su carácter filtrable y por no ser visible en el microscopio, y que más tarde se llamó virus del mosaico de tabaco. Este nuevo tipo de agente infeccioso, denominado simplemente virus, se caracterizó por ser demasiado pequeño para ser retenido por métodos de filtración bacteriana, demasiado pequeño para ser visto con el microscopio y no cultivable *in vitro*. Beijerinck repitió los experimentos de filtración de sus predecesores y concluyó que lo que pasaba a través de los filtros de porcelana seguía siendo infeccioso y era estéril de microorganismos. Encontró que a partir de la savia de una planta enferma, un número infinito de plantas sanas podían ser inoculadas e infectadas, con lo que concluyó que el agente infeccioso se reproduce en las plantas enfermas. Encontró que el extracto infeccioso era estable durante tres meses, y su virulencia no aumentaba ni disminuía, evidencia adicional de que no se trataba de bacterias. También observó que el virus seguía siendo viable, incluso después de que el tejido se secara, pero que el calentamiento del extracto a 90° lo inactivaba. Además, dedujo correctamente que el virus se movía dentro de la planta en el floema, aunque “sentía” que ocasionalmente también se movía por el xilema (Beijerinck, 1898)

Estos tres investigadores describieron de forma independiente al agente causal de una enfermedad desconcertante. Tobacco mosaic virus fue el primer virus que se describió y ha sido muy importante en la historia de la virología por muchas razones más allá del descubrimiento del concepto viral. Desde su descubrimiento, TMV ha servido como modelo experimental y conceptual para el estudio de los virus de plantas y de las interacciones con sus hospedantes. De hecho, la proteína 30K de TMV fue la primera proteína de movimiento célula a célula (MP) en ser descrita. Esta MP ha surgido como modelo para estudiar los mecanismos moleculares del transporte célula a célula. Además, TMV fue el primer virus en ser purificado químicamente (Stanley, 1935) y visualizado, su RNA fue el primer genoma viral en ser demostrado suficiente para lograr la infectividad, y su proteína de cubierta fue la primera proteína viral secuenciada. Además, muchos otros conceptos fundamentales para la virología, se desarrollaron y siguen desarrollándose con TMV.

1.2. Interacción de los virus con sus hospedantes

Las interacciones entre un virus y sus células hospedantes desempeñan un papel central en el ciclo de infección viral. Por lo tanto, comprender las interacciones virus-hospedante es fundamental para determinar los mecanismos de las infecciones virales. Para que los virus invadan activamente las plantas, tienen que perturbar los procesos existentes en las células vegetales y manipular la maquinaria celular necesaria para completar su ciclo infectivo, a la vez que contrarrestar los sistemas de defensa disparados por la planta.

Los virus codifican proteínas necesarias para su replicación, movimiento, supresión del silenciamiento génico y encapsidación. A lo largo de la evolución, han desarrollado complejas relaciones con sus hospedantes biológicos, convirtiendo a las infecciones virales en procesos complejos que dependen de interacciones coordinadas y equilibradas entre los factores codificados por los virus y los codificados por sus hospedantes. Debido a esta complejidad, las infecciones sistémicas de los virus se limitan generalmente a un cierto rango de hospedantes. Mientras que algunas especies de plantas permiten el movimiento sistémico de un determinado virus, otras pueden restringirlo a las hojas inoculadas o incluso a la célula inicialmente infectada. Así mismo, los virus que logran infecciones sistémicas pueden no ser capaces de infectar todos los tejidos del hospedante. Si bien la capacidad de los virus para invadir y causar la infección sistémica de las plantas depende en gran medida de factores virales y celulares que ayuden a la replicación y el movimiento del virus, el resultado de la infección también está determinado por las defensas antivirales de las plantas y la capacidad de los virus para evadirlas. El resultado de esta competencia conduce a una resistencia completa de la planta, si el virus no puede superar las defensas disparadas por la planta, o una infección sistémica, eventualmente terminando con la muerte del hospedante, si la contra defensa viral es lo suficientemente eficaz como para evitar la protección sistémica de la planta, o situaciones intermedias, las cuales siempre dependen de la interacción con el ambiente, y/o con vectores que los transmiten. La rápida evolución de los virus les ha permitido generar variantes de genes de avirulencia, sorteando las barreras moleculares de defensa de las plantas. A su vez, como estrategia para superar la aparición de nuevos virus, las plantas co-evolucionan generando genes de resistencia mediante procesos de recombinación. Una importante estrategia de defensa antiviral de las plantas es el reconocimiento específico de las proteínas efectoras virales por los productos génicos de resistencia de la planta y la posterior iniciación de una respuesta hipersensible (HR) que conduce a la muerte celular. Esta respuesta detiene la propagación del virus restringiéndolo a las células inicialmente infectadas. Como una segunda capa de defensa, la HR produce una señal sistémica (*non-cell autonomous*) que conduce a una resistencia sistémica adquirida (SAR) que proporciona protección no específica

contra un amplio espectro de patógenos (Durrant and Dong, 2004). Otro importante mecanismo de defensa antiviral es el silenciamiento de RNA, que se propaga célula a célula y sistémicamente por floema provocando la degradación del RNA viral (Baulcombe, 2004; Ding and Voinnet, 2007; Incarbone and Dunoyer, 2013).

1.3. Biodiversidad viral

El estudio de la biodiversidad de los virus vegetales ha implicado un gran desafío, ya que a diferencia de otros organismos, los virus carecen de RNA ribosomales u otros genes universales a partir de los cuales se estudie su diversidad (Seifert, 2009; Stackebrandt and Goebel, 1994). Sin embargo, se han utilizado varios métodos para el descubrimiento viral, con diferentes resultados y eficiencias. Las herramientas de diagnóstico tradicionales para los virus de plantas incluyen inoculación de plantas indicadoras, pruebas serológicas (ELISA), diversas técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y microscopía electrónica (ME), y más recientemente PCR o RT-PCR y sus formas cuantitativas. Actualmente, el surgimiento de nuevas tecnologías en biología molecular como los *microarrays* y el *deep sequencing*, están brindando una imagen muy diferente del mundo de la virología vegetal (Boonham et al., 2007; Grover et al., 2010). La secuenciación de genomas completos permite comprender diversos aspectos de la virología, como el número, tamaño y localización de los genes en el genoma viral; la secuencia aminoacídica, la función de sus proteínas, y las especies generadas de la expresión de su genoma. La capacidad de manipular genéticamente a los virus mediante la generación *in vitro* de transcriptos infectivos a partir de secuencias clonadas de cDNA (Ahlquist et al., 1984), ha permitido avanzar en el estudio de las funciones génicas.

2. Los ophiovirus

Como ocurrió en el siglo pasado con la enfermedad del tabaco y muchas otras enfermedades de plantas, la naturaleza de sus agentes causales no se determinó hasta hace algunas décadas. Una antigua enfermedad conocida como psorosis de los cítricos se describió por primera vez en 1891, pero fue casi un siglo más tarde cuando el agente viral pudo ser observado mediante microscopía electrónica como una partícula filamentosa y espiralada (Derrick et al., 1988). Sin embargo, la verdadera morfología fue observada en 1994, por Robert G. Milne, quien encontró que los viriones del virus de la psorosis de los cítricos, Citrus psorosis virus (CPsV), eran partículas delgadas, filamentosas y circulares que se asemejaban a aquellas observadas en tenuivirus y a las nucleocápsides de miembros de la familia *Bunyaviridae* (García et al., 1994) como el tospovirus TSWV. En los años siguientes, Milne descubrió nuevos

virus (Vaira et al., 2006; Vaira et al., 1997) con una morfología similar que más tarde formarían parte de un nuevo género, *Ophiovirus*, derivado del griego "ophios", que significa serpiente, haciendo referencia a la forma alargada, retorcida y en espiral de las partículas virales (Figura 3).

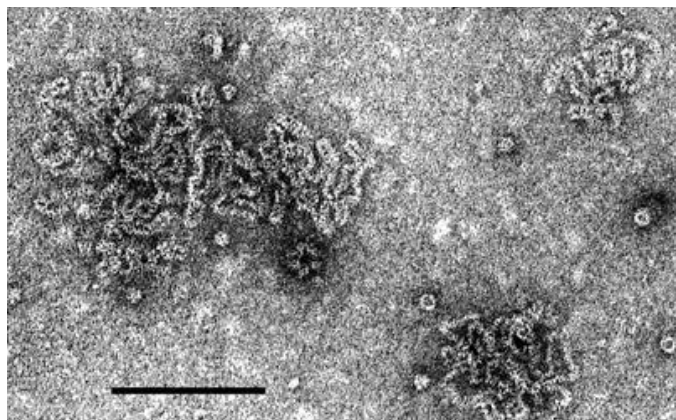


Figura 3. Micrografía electrónica de contraste negativo (acetato de uranilo) de viriones de un aislamiento del ophiovirus *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV). La barra representa 100 nm. (ICTV 9th Report, 2011)

Los ophiovirus son virus de plantas con genoma a RNA de simple cadena y polaridad negativa causantes de importantes enfermedades en cultivos de cítricos, lechuga, arándanos y plantas ornamentales. Hasta la fecha, además de CPsV, otros seis virus con morfología similar han sido identificados las especies: *tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV), causante de rayado y moteado de hojas en tulipán (Morikawa et al., 1995); *rannunculus white mottle virus* (RWMV) (Vaira et al., 2003), encontrado en dos especies de la familia *Ranunculaceae*; *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV), causante del *big-vein* de lechuga (van der Wilk et al., 2002); *lettuce ring necrosis virus* (LRNV), causante de la enfermedad *ring necrosis* en cultivos de lechuga (Bos and Huijberts, 1996; Torok and Vetten, 2002), *fressia sneak virus*, responsable del necrosado en hojas de fresias (FreSV) (Vaira et al., 2009; Vaira et al., 2007) y *blueberry mosaic associated virus* (BIMaV), asociado a los síntomas de mosaico observados en cultivos de arándanos (Thekke-Veetil et al., 2014). En el año 2009, el Comité internacional de taxonomía de virus (ICTV, *International Committee of Taxonomy of Viruses*) encuadró a este género dentro de una nueva familia de virus, la familia *Ophioviridae*. Esta familia está clasificada dentro de “*Negative sense ssRNA viruses*”, pero fuera del orden *Mononegavirales* (ICTV, 9th Report (King et al., 2011)).

En la Figura 4 se muestra un árbol filogenético donde se observan las relaciones entre los ophiovirus y todas las demás familias de virus negativos. Este árbol se construyó con las secuencias del módulo de las RdRp de virus a RNA de cadena negativa representativos del orden *Mononegavirales*, y familias *Arenaviridae* y *Ophioviridae*, y del género *Tenuivirus*.

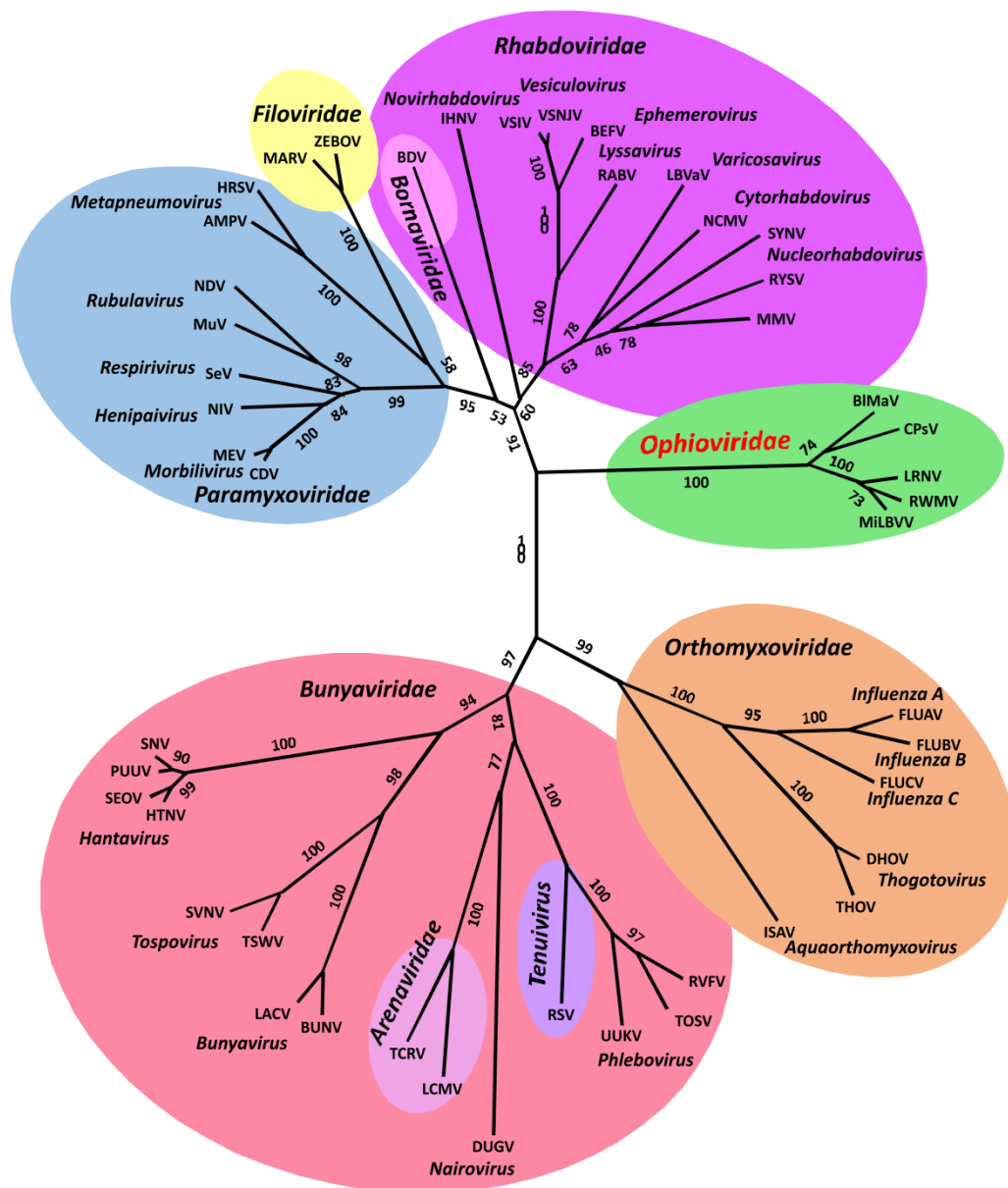


Figura 4. Árbol filogenético no *rootado* de miembros de la familia *Ophioviridae* y de todos los virus a RNA de cadena negativa basado en la secuencia de módulo de la RdRp conservado entre las RNA polimerasas RNA dependientes. Las especies de ophiovirus con que se cuenta dicha secuencia son de sólo 5 de los 7 miembros: RWMV, MiLBV, CPs, BIMA y LRNV. Las longitudes de rama son proporcionales a las distancias genéticas entre secuencias (ICTV, 2017, en prensa).

El genoma de estos virus se divide en tres o cuatro segmentos encapsidados individualmente por un único tipo de proteína de cubierta. El RNA 1 codifica una pequeña proteína involucrada en la supresión del silenciamiento génico post-trascricional (PTGS) (Reyes et al., 2016; Robles Luna et al., 2017b) y luego de una región intergénica (IR) de aproximadamente 100 nucleótidos, se encuentra el gen de la RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp). Dado que ningún virus con genoma a RNA negativo segmentado de plantas ni animales poseen dos ORFs en el segmento mayor de su genoma, con la RdRp ubicada luego de una IR, esta organización genómica es una característica particular de esta familia de virus. La proteína de movimiento (MP) de los ophiovirus está codificada en el RNA2 (Hiraguri et al., 2013; Robles Luna et al., 2013) y también participa en la supresión del PTGS (Robles Luna et al., 2017b). Los ophiovirus, al igual que otros virus de plantas con genoma de polaridad negativa, además de encapsidar a los RNAs virales genómicos (vRNA) (de polaridad negativa), también encapsidan los virales complementarios (vcRNA, de polaridad positiva), aunque mucha menor proporción. Los ophiovirus solo poseen una única proteína de cubierta (coat protein, CP) codificada por el RNA 3 (Sánchez de la Torre et al., 1998), que presenta interacción homóloga, además de interaccionar con la MP en el citoplasma (Robles Luna et al., 2013).

La complejidad de la organización genómica de los ophiovirus y sus estrategias de replicación, han impedido hasta el momento, el desarrollo de un sistema de clones infectivos mediante genética reversa, y por ende tampoco estudios funcionales sobre las proteínas codificadas por estos virus utilizando métodos estándar de mutagénesis en el contexto de la infección. Esto nos ha limitado a estudiar la función de sus proteínas en forma aisladas o combinadas usando otras estrategias, pero no dentro del ciclo de infección.

2.1. La psorosis de los cítricos

2.1.1. Importancia económica y sintomatología

La psorosis de los cítricos es una enfermedad causada por el ophiovirus *Citrus psorosis virus* (CPsV), que produce un deterioro progresivo de los árboles al afectar sus tejidos conductores. Si bien en algunas especies de cítricos la enfermedad puede ser menos agresiva, el síntoma más característico en los árboles adultos a campo es el escamado de la corteza del tronco y de las ramas principales. Se observa acumulación de gomas por debajo de las lesiones de la corteza y puede impregnar el xilema produciendo oclusión de los vasos, y manchas en la madera (Roistacher, 1993). En primavera, en los brotes jóvenes pueden observarse manchas cloróticas (*flecking*) y manchas en forma de anillos (*ringspots*) en hojas, y en algunos casos en

el fruto (Martín et al., 2002) (Figura 5). Los aislamientos más severos pueden producir pústulas y producción de goma en el envés de las hojas, pecíolos y ramas jóvenes. Existe variación en la intensidad de los síntomas de psorosis según los aislamientos, el clima, la época del año y las variedades cultivadas. Las especies de cítricos más afectadas son el naranjo dulce, pomelo y mandarino. Otras especies, como el naranjo amargo y limonero muestran síntomas típicos en las hojas, pero permanecen libres de lesiones en la corteza (Milne et al., 2003; Moreno et al., 2015). La enfermedad se ha reportado en muchas regiones productoras de cítricos a lo largo de todo el mundo. Por lo general, los árboles infectados no mueren, pero el virus les causa un decaimiento lento y eventualmente se vuelven improductivos, causando importantes daños a la industria cítrica.

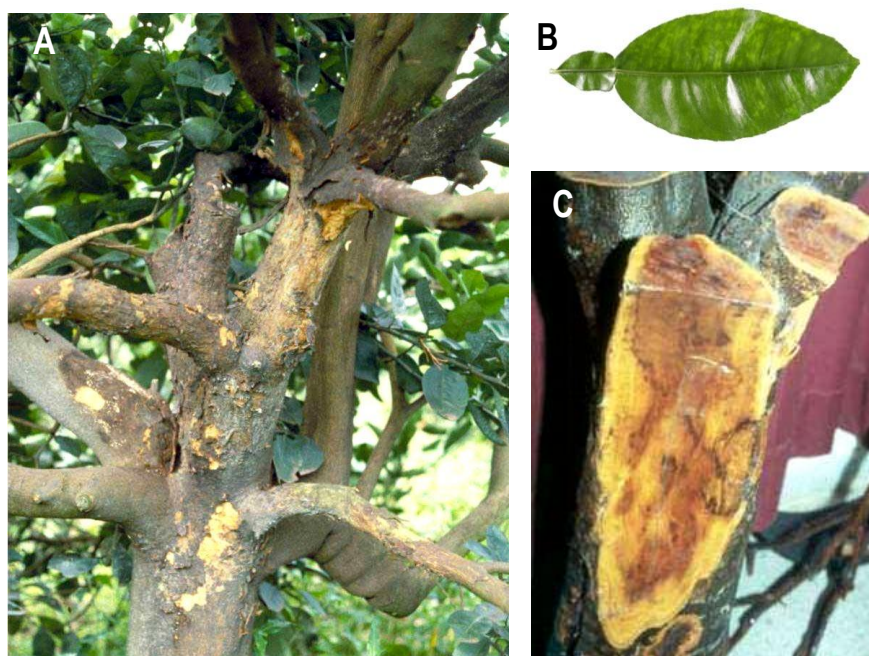


Figura 5. Síntomas característicos de la enfermedad psorosis de los cítricos. A) Descascarado de la corteza del tronco y ramas principales. B) Manchas cloróticas en hojas. C) Manchas en la madera.

2.1.2. Transmisión

El virus se transmite por injerto, pero los síntomas raramente aparecen antes de que los árboles tengan 10 años de edad, y cuando se propagan brotes infectados de árboles asintomáticos en el momento de toma de yemas, explicando en parte la alta incidencia de la enfermedad en algunas zonas citrícolas (Moreno et al., 2015). Con mayor o menor dificultad diferentes aislamientos de CPsV son mecánicamente transmitidos a *Chenopodium quinoa*

donde producen lesiones locales necróticas, y a *Gomphrena globosa* dando el mismo tipo de lesiones locales, pero en ésta última el virus puede moverse a hojas superiores dando una infección sistémica, manifestándose con lesiones locales (Milne et al., 2003; Roistacher, 1993) (Figura 6). Los ensayos de transmisión por semillas fueron realizados cuando no se conocía el agente causal de la enfermedad, dando como resultado que podría transmitirse en semillas de especies trifoliadas, usadas como patrón o pie en Argentina y otros países. Sin embargo, actualmente no existen pruebas experimentales que demuestren la transmisión de CPsV por semilla, a menos aún en otras especies (D'Onghia et al., 1998). En Texas, análisis espaciales y espacio-temporales en cultivos de cítricos con árboles infectados por psorosis, fueron consistentes con la propagación de la enfermedad a través de vectores, siendo un candidato *Olipidium brassicae* (Gottwald et al., 2005), pero estos ensayos preliminares tampoco han sido confirmados.

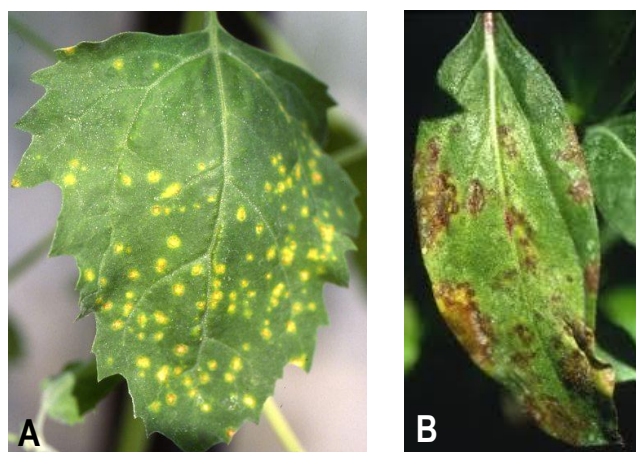


Figura 6. Síntomas locales producidos por CPsV en hospedantes herbáceos experimentales. Anillos cloróticos y necróticos en hojas de A) *Chenopodium quinoa* y B) *Gomphrena globosa*.

2.1.3. Una mirada dentro de la biología de *Citrus psorosis virus*

El genoma de CPsV es tripartito, de RNA monocatenario y polaridad negativa (Kormelink et al., 2011) (Figura 7). El RNA 1 presenta un ORF en el extremo 5' que codifica para la proteína denominada 24K, que está involucrada en la supresión del PTGS y en el procesamiento de microRNAs (Reyes et al., 2016; Robles Luna et al., 2017b). Hacia el extremo 3', una región intergénica de 109 nt, y un segundo ORF que codifica para la RdRp viral (Naum-Ongania et al., 2003). El RNA 2 codifica para la proteína de movimiento viral célula a célula 54K (MP^{CPsV}) (Robles Luna et al., 2013) y también involucrada en la supresión del silenciamiento génico (Robles Luna et al., 2017b; Sanchez de la Torre et al., 2002). El RNA 3 contiene el ORF que codifica para la proteína de cubierta viral (CP) (Sánchez de la Torre et al., 1998).

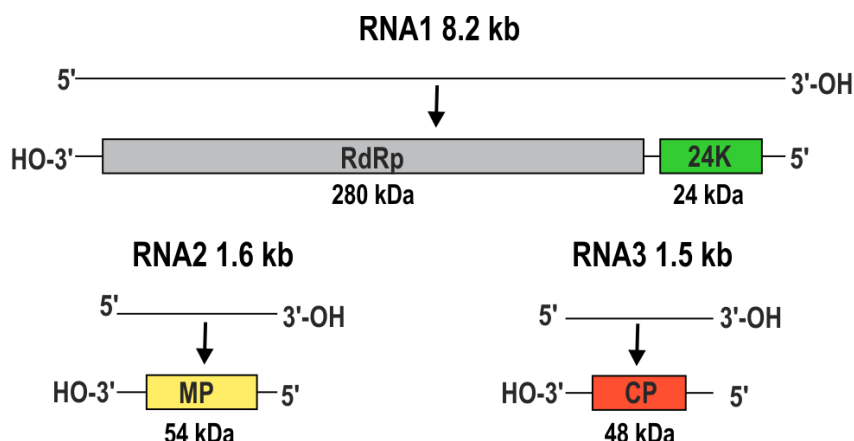


Figura 7. Organización genómica de *Citrus psorosis virus* (CPsV). Los cuadrados representan los ORFs. Se indica la longitud de cada segmento de RNA y los tamaños aprox. de los productos de expresión de los ORF, que es también como se denominan las proteínas (24K, 48K y 54K).

Los conocimientos acerca del ciclo de infección de CPsV son escasos. Sin embargo, se ha avanzado en la localización subcelular y las funciones de las proteínas 24K, CP y MP (Peña et al., 2012; Reyes et al., 2016; Robles Luna et al., 2013; Robles Luna et al., 2017a; Robles Luna et al., 2017b). La localización subcelular de las proteínas CP y MP se analizó mediante fraccionamiento subcelular de *C. quinoa* infectada y por microscopía confocal (CLSM) usando proteínas de fusión a GFP expresadas transitoriamente en *Nicotiana benthamiana*. La proteína MP se encontró en núcleo, citoplasma, pared celular y fracción microsomal, y mediante CLSM, la proteína de fusión MP:eGFP se encontró en el núcleo, citoplasma y plasmodesmos (PD) (Robles Luna et al., 2013). Aplicando las mismas estrategias, la CP sólo se localizó en el citoplasma (Peña et al., 2012) y la 24K fue encontrada mayoritariamente en núcleo y nucléolo (Reyes et al., 2016; Robles Luna, 2014). Estos resultados apoyan las funciones de supresión del PTGS y de movimiento viral determinadas en las proteínas 24K y MP, mientras que la CP sólo se la ha encontrado asociada a la encapsidación, aunque probablemente como la mayoría de las proteínas virales, son multifuncionales.

2.2. El “*Big-vein*” de lechuga

2.2.1. Importancia económica y sintomatología

El *big-vein* de lechuga es una enfermedad transmitida por un vector de suelo que afecta a las principales áreas de producción de lechuga (*Lactuca sativa*) en todo el mundo. Fue descrita por primera vez en California en el año 1934 (Jagger and Chandler, 1934), pero ha sido

encontrada por todo el mundo, principalmente en regiones frías a templadas y menos frecuentemente en áreas subtropicales. El *big-vein* causa serios problemas en los cultivos de lechuga durante los períodos más fríos del año (Barcala Tabarrozzi et al., 2010; Huijberts et al., 1990; Roggero et al., 2000; Vetten et al., 1987) afectando todos los tipos de lechuga que crecen en suelo al aire libre o bajo cubierta, y en los cultivos hidropónicos (Roggero et al., 2003). La importancia económica de la enfermedad se debe a los síntomas del follaje, que reducen el valor de mercado, y a los retrasos en la formación de la roseta y la disminución del tamaño de la planta, lo que reduce la proporción de plantas cosechables. Los principales síntomas de *big-vein* son el aclaramiento de la región próxima a las venas, arrugas y distorsión de las hojas (Walsh, 1994) (Figura 8). Estos síntomas se hacen más evidentes en la lechuga crecida en invierno bajo ambientes protegidos, donde el hongo vector se desarrolla mucho más rápidamente. La enfermedad está asociada con dos virus, Lettuce big-vein associated virus (LBVaV; género *Varicosavirus*) y Mirafiori lettuce big-vein virus (MiLBVV; género *Ophiovirus*) (Fauquet et al., 2005).



Figura 8. Síntomas de 'big-vein' en plantas de lechuga

LBVaV, anteriormente llamado Lettuce big-vein virus, fue descrito por primera vez por Kuwata et al. (1983) y se pensó que era el agente causal de la enfermedad por casi dos décadas. Sin embargo, no había evidencias de que LBVaV indujera síntomas de *big-vein* en lechuga. El segundo virus asociado con la enfermedad, MiLBVV, fue descubierto por Roggero et al. (2000). Posteriormente, Lot et al. (2002) reportaron que las plantas de lechuga infectadas con LBVaV no desarrollaban síntomas en ausencia de MiLBVV y que las plantas de lechuga infectadas con MiLBVV desarrollaban síntomas de *big-vein* independientemente de la presencia o ausencia de LBVaV. Por lo tanto, actualmente se considera a MiLBVV como el único agente causal del *big-vein* de lechuga (Lot et al., 2002; Sasaya et al., 2008; Sasaya and Koganezawa, 2006).

2.2.2. Transmisión

MiLBVV es transmitido por zoosporas móviles del hongo *Oplidium virulentus* (antiguamente nombrado *O. brassicae*) (Sasaya and Koganezawa, 2006; Vaira et al., 2011). Las esporas pueden persistir durante más de 20 años en el suelo, conservando la capacidad de transmitir la enfermedad durante más de 15 años (Campbell, 1996). Esta asociación virus-vector representa un serio problema en los intentos de evitar la propagación de la enfermedad a campo, debido a la falta de productos químicos adecuados para el suelo y a la larga vida de las esporas en reposo. Se ha demostrado que MiLBVV está presente en la maleza *Sonchus oleraceus*, que puede actuar como un reservorio natural para la infección de lechuga por medio del hongo vector (Navarro et al., 2005). Las prácticas culturales para reducir las pérdidas son limitadas: la rotación de cultivos no ha tenido éxito, y aunque existen algunos cultivares de lechuga que pueden tener diferente tolerancia a la enfermedad, no se conoce un germoplasma que presente resistencia a *big-vein* (Bos and Huijberts, 1990; Ryder and Robinson, 1995). Así, como se ha demostrado para MiLBVV, las zoosporas de *Oplidium* spp. también transmiten TMMMV, LRNV y FreSV (Lot et al., 2002; Meekes and Verbeek, 2011; Navarro et al., 2004; Sasaya and Koganezawa, 2006; Vaira et al., 2006), pero no se conoce el vector de RWMV, CPsV y BIMaV.

2.3. El genoma de Mirafiori lettuce big-vein virus

MiLBVV es un virus segmentado con genoma a RNA de cadena simple y de polaridad negativa, aunque las partículas virales contienen cantidades casi equimolares de moléculas de RNA de ambas polaridades. El genoma consta de cuatro RNAs con siete ORFs (Vaira et al., 2011) (Figura 9). El RNA1 codifica para la polimerasa viral y una proteína de 25 kDa (Naum-Ongania et al., 2003; van der Wilk et al., 2002). El RNA2 es *ambisense*, codifica una proteína en el RNA genómico viral, de aproximadamente 10 kDa, y la MP^{MiLBVV} o 55K que está codificada en la cadena viral complementaria (Hiraguri et al., 2013; Robles Luna et al., 2013). La CP está codificada en el RNA3, y el RNA4 contiene dos ORFs solapados en diferentes marcos de lectura, el primero codifica una proteína con una masa molecular aproximada de 37 kDa, y el segundo, que carece de codón de iniciación, codificaría una proteína de aproximadamente 10 kDa. Esta posible proteína podría estar siendo expresada por un *+1 ribosomal frameshift*, pero no ha sido probado experimentalmente.

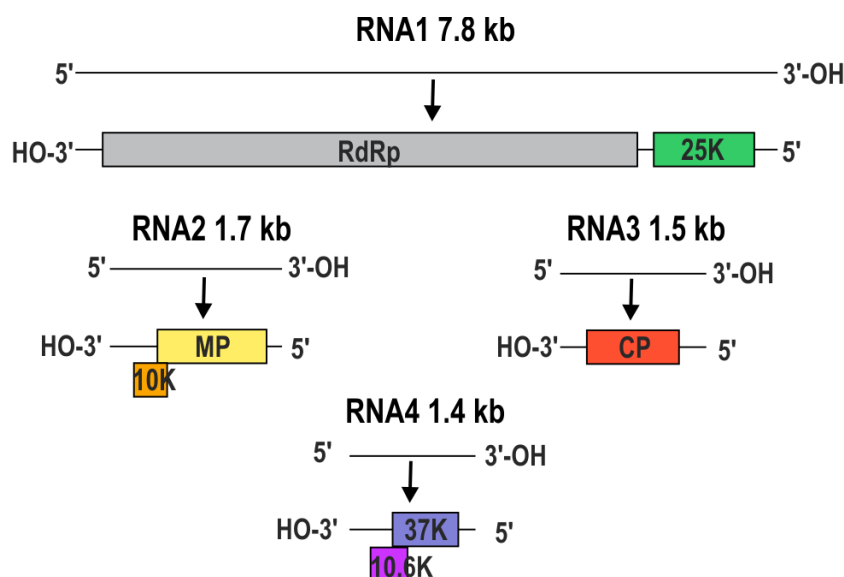


Figura 9. Organización genómica de *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV). Los cuadrados de colores representan los ORFs predichos. Se indica la longitud de cada segmento de RNA.

3. Movimiento viral

La infección exitosa de un virus en su hospedante vegetal surge de su capacidad de propagación desde el sitio inicial de la infección a los tejidos y órganos distantes. Una vez dentro de la célula vegetal, los virus se replican en el sitio de infección y se propagan célula a célula para crear un foco de infección local, hasta que se encuentran con los tejidos vasculares, donde se cargan en los elementos del floema para distribuirse por toda la planta. Este transporte implica varias etapas en diferentes compartimentos celulares: intracelularmente desde el sitio de replicación hasta la periferia celular, intercelularmente a través de la pared celular hasta las células adyacentes, a través de los tejidos hasta el sistema vascular y a través de los elementos conductores del sistema vascular a los tejidos más distantes del sitio de infección, donde el virus puede iniciar una infección sistémica (Harries and Nelson, 2008; Hull, 2014b; Schoelz et al., 2011; Tilsner et al., 2014; Ueki and Citovsky, 2007). En todas las etapas intercelulares, los virus deben atravesar la pared celular vegetal por los PD. Para esto, los virus de plantas han desarrollado una clase especial de proteínas, llamadas proteínas de movimiento (MPs), que facilitan el transporte intercelular de complejos de ribonucleoproteínas virales (vRNP) o partículas virales (Benitez-Alfonso et al., 2010; Carrington et al., 1996; Lucas, 2006; Scholthof, 2005; Taliansky et al., 2008).

3.1. Plasmodesmos: las puertas de la comunicación simplástica

Dado que los protoplastos vegetales están separados entre sí por la pared celular, las plantas han desarrollado canales ligados a la membrana plasmática denominados plasmodesmos (PDs) que establecen una vía de comunicación simplástica entre las células vecinas de las plantas (Ehlers and Kollmann, 2001) (Figura 10). Esta conexión simplástica proporcionada por los PDs hace que la planta pueda regular su homeostasis mediante cambios en la estructura de los PDs, en su composición bioquímica, o modificando la cantidad de PDs que conectan las diferentes células entre sí (Cantrill et al., 2001; Ehlers et al., 1999; Ehlers and Kollmann, 2001; Epel and Erlanger, 1991; Erwee and Goodwin, 1985; Gisel et al., 1999; Kim et al., 2002; Lucas et al., 1993; Rinne et al., 2001; Ruan et al., 2001; Shepherd and Goodwin, 1992a, b; van der Schoot et al., 1995; van der Schoot and Rinne, 1999).

La capacidad de los PDs para permitir el transporte intercelular se mide generalmente en términos de su límite de exclusión de tamaño (SEL, *size exclusion limit*) (Ding et al., 1999). El SEL se define como el tamaño, expresado como masa molecular, del colorante fluorescente más grande que se moverá a través de los PDs entre células contiguas (McLean et al., 1997).

Los virus de plantas están restringidos a cumplir su ciclo viral en el simplasto, utilizando los PDs para invadir las células vecinas (Lucas, 2006), estableciendo una comunicación simplástica y con el tejido floemático. Esta vía es esencial para la señalización intercelular espaciotemporal en el desarrollo de la planta, y que es explotada por los virus para mover sus genomas por toda la planta.

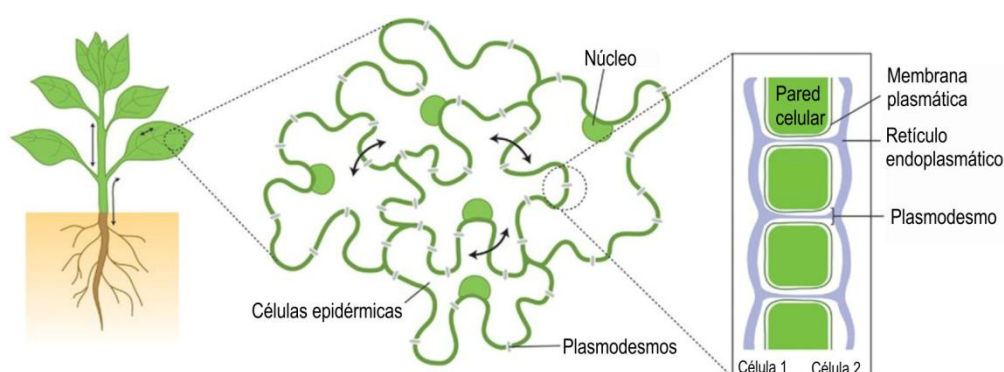


Figura 10. La infección sistémica de una planta depende de la comunicación celular a corta y larga distancia. El citoplasma de las células vegetales presenta una continuidad dada por los plasmodesmos que es aprovechada por los virus para su diseminación. Tomado de Maule et al., 2012, con modificaciones

3.1.1. Estructura y función de los PDs

Los PDs son canales recubiertos de membrana plasmática que atraviesan la pared celular de células adyacentes. Se forman durante la citocinesis, cuando un componente del ER queda atrapado en el fragmoplasto en desarrollo, formando un elemento central membranoso denominado desmotúbulo. El espacio entre la membrana plasmática y el desmotúbulo contiene canales citoplasmáticos, a través de los cuales las moléculas solubles se mueven de una célula a otra (Bell and Oparka, 2011; Benitez-Alfonso et al., 2006). Los PDs están rodeados de pared celular enriquecida en pectina y contiene glucanos insolubles (calosa) depositados sobre la región de la pared alrededor del cuello del PD (Figura 11).

Los virus han desarrollado mecanismos para adaptar las propiedades funcionales de los PDs y permitir su propagación. Esta adaptación se manifiesta con la acción de las MPs virales, que se requieren específicamente por el virus para modificar el SEL y mediar su propagación a través de los PDs (Heinlein, 2015; Leisner, 1999; Lucas, 2006).

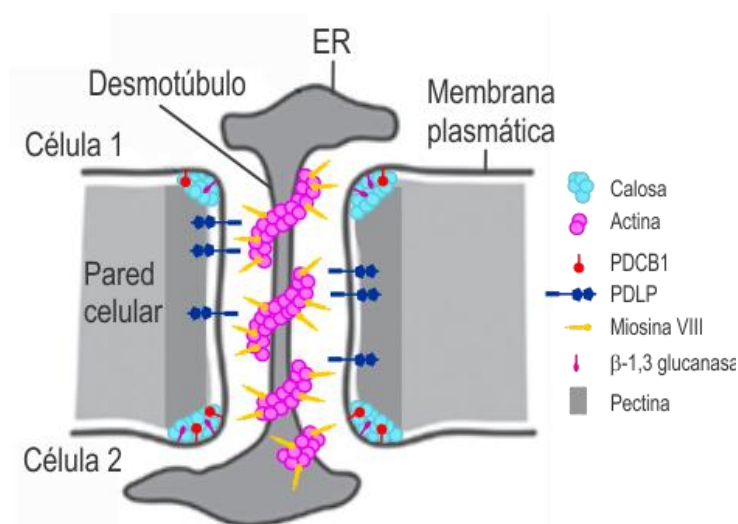


Figura 11. Dibujo de un plasmodesma simple que muestra la organización general y la ubicación de las proteínas asociadas a la estructura: PDCB1, *plasmodesmata callose binding protein*; PDLP, *plasmodesmata located proteins*; actina; miosina VIII y β 1,3-glucanasas. La región de la pared celular donde se ubican los PD es rica en pectina. En la región del cuello se encuentran depósitos de calosa. ER: retículo endoplasmático.

El SEL de los PDs está bajo un estricto control y cambios durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Las hojas más jóvenes, que actúan como sumideros fisiológicos de fotoasimilados, tienen PDs con un SEL globalmente mayor que los PDs en tejidos maduros, que son fuente de fotoasimilados. Sin embargo, a pesar del SEL restringido en las hojas maduras, las células tanto de hojas maduras como inmaduras interactúan con las células vecinas y pueden tener PDs en diferentes grados de apertura: cerrados, abiertos y dilatados; indicando que la apertura

del PD es individualmente regulada por cada célula y capaz de responder a señales específicas (Crawford and Zambryski, 2001). La maduración de la hoja y la disminución global correspondiente del SEL, se han correlacionado con un cambio en la estructura de PD "simple" a "ramificado" (Oparka et al., 1999). En los tejidos maduros, los PDs exhiben una morfología más compleja donde los PDs se ramifican y/o se fusionan entre sí. La regulación de los PDs durante el desarrollo es necesaria por su papel crítico en el transporte de moléculas, como por ejemplo las implicadas en la señalización durante la morfogénesis.

Si bien la base molecular de la regulación de la permeabilidad de los PDs durante el desarrollo sigue siendo desconocida, puede involucrar un subconjunto de los ocho miembros descritos de las proteínas PDLs (*Plasmodesmata located proteins*). Mientras que el papel de las PDLs en el transporte de las proteínas endógenas de las plantas aún no se ha determinado, su participación en el movimiento viral sí ha sido demostrada. Por ejemplo, las PDLs probablemente participan en el movimiento de *Grape fan leaf virus* (GFLV) y de CaMV, cuyas MPs forman estructuras tubulares que se extienden sobre los PDs y destruyen su estructura (Ritzenthaler and Hofmann, 2007). Además, un estudio reciente reveló que las ocho PDLs interaccionan con la MP de GFLV y sirven como puntos de anclaje para iniciar la formación de estos túbulos (Amari et al., 2010). En el triple mutante *pdlp1/2/3*, tanto GFLV como CaMV mostraron propagación local y sistémica retardada, lo que demuestra la importancia de las PDLs en el movimiento célula a célula y larga distancia de estos virus (Amari et al., 2010).

3.1.2. Mecanismos virales que controlan la apertura de los PDs

Interferencia con la actina asociada a los PDs

Varios estudios indican que la apertura de los PDs está controlada directa o indirectamente por los filamentos de actina (Su et al., 2010; White and Barton, 2011). Consistentemente con el papel de la actina en el control de la apertura de los PDs, se demostró que las MPs de TMV y de *Cucumber mosaic virus* (CMV) muestran actividad de corte de actina *in vitro*. Además, la estabilización de los filamentos de actina por tratamiento con faloidina, altera la capacidad de las MPs para aumentar el SEL del PD *in vivo* (Su et al., 2010). Sin embargo, aunque estos hallazgos sugieren que las MPs manipulan los filamentos de actina para controlar la apertura de los PD, queda por demostrar si la actividad de corte de actina de estas MPs ocurre en el PD o en otra parte de la célula. Tampoco está claro si estas MPs interaccionan efectivamente *in vivo* con la actina. Es posible que la reorganización del citoesqueleto de actina por las MPs virales de lugar a un cambio de la estructura del PD y un aumento concomitante en el SEL.

Interferencia con la deposición de calosa

La calosa es el componente regulador más estudiado de los PDs. Cuando se acumula en niveles altos en la región del cuello del PD, actúa como un esfínter molecular que restringe el canal y limita el tráfico macromolecular (Zavaliev et al., 2011) (Figura 12).

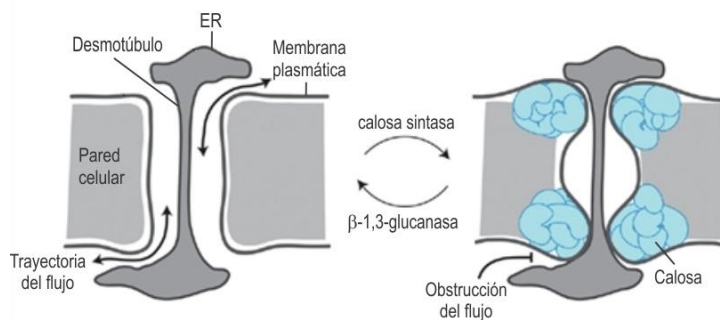


Figura 12. La apertura de los plasmodesmos está regulada por la deposición de calosa en la pared celular alrededor del cuello del poro. Las calosa sintasas y β -1,3-glucanasas localizadas en el plasmodesmo controlan los niveles de calosa, que determinan si el plasmodesmo está abierto (izquierda) o cerrado (derecha) y si el movimiento puede ocurrir libremente (izquierda) o está obstruido (derecha). Tomado con modificaciones de Maule *et al.*, 2012

De esta forma, otro mecanismo posible para controlar la permeabilidad de los PDs, es la deposición e hidrólisis de calosa (β -1,3-glucano) existente en el cuello del PD. La calosa se deposita en la región del cuello del PD en respuesta al estrés, incluyendo heridas y ataques de patógenos (Zavaliev et al., 2011). Los niveles de calosa se determinan por el equilibrio entre su biosíntesis por calosas sintasas y la degradación por β -1,3-glucanasas (Sagi et al., 2005; Zavaliev et al., 2010). Específicamente, un aumento de calosa en el PD disminuye el SEL (Radford et al., 1998; Radford and White, 2001; Sivaguru et al., 2000). Por lo tanto, la deposición de calosa en el cuello del PD, es otro de los mecanismos que puede modificar un virus para controlar la permeabilidad de los PDs y favorecer la infección. El silenciamiento de β -1,3-glucanasa en *Nicotiana sylvestris* induce la acumulación de calosa alrededor de las lesiones de TMV y la reducción del SEL, lo que da como resultado una susceptibilidad disminuida a TMV (Beffa et al., 1996; Iglesias and Meins, 2000). Evidencias experimentales indican que la MP de TMV permite el movimiento través de los PDs evitando la deposición de calosa inducida por la infección. La degradación de calosa promovida por la coexpresión ectópica de β -1,3-glucanasa durante la infección por TMV aumenta el SEL del PD y facilita el movimiento intercelular del virus (Bucher et al., 2001). Por otro lado, la infección con un mutante de TMV que carece de las proteínas CP y MP (TMV Δ CP Δ MP) condujo a la deposición de calosa alrededor del PD en plantas de tabaco (*N. tabacum*), mientras que un nivel reducido de acumulación de calosa se ha observado en plantas transgénicas MP infectadas con

TMV Δ CP Δ MP (Levy et al., 2007). Así, la calosa se acumula como resultado del mecanismo de defensa de la planta para inhibir la propagación del virus, mientras que la MP con la replicasa viral regulan la degradación de la calosa para la apertura del PD. Esto sugiere claramente que existe una correlación negativa entre la acumulación de calosa y la propagación del virus. Para explicar este efecto, se ha propuesto que la MP puede reclutar β -1,3 glucanasas para degradar la calosa inducida por estrés en los PD (Epel, 2009; Guenoune-Gelbart et al., 2008). Esta hipótesis se basa en estudios que indican una correlación positiva entre la expresión de β -1,3-glucanasa y la propagación viral (Beffa et al., 1996; Bucher et al., 2001; Iglesias and Meins, 2000).

Además, se determinó por ensayo de doble híbrido que la proteína TGBp2 de PVX interacciona con tres proteínas del hospedante que a su vez interaccionan con β -1,3-glucanasa (Fridborg et al., 2003). Aunque este hallazgo sugiere la posibilidad de que la TGBp2 reclute β -1,3-glucanasas al PD para aumentar SEL a través de una interacción con las proteínas del hospedante, queda por demostrar que estas interacciones ocurran *in vivo*, especialmente durante la infección viral. También debe demostrarse que la interrupción de tales interacciones tiene un efecto negativo en el movimiento viral.

Niveles celulares de especies reactivas de oxígeno

Además de la actina y los depósitos de calosa, existen cada vez más evidencias de que los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) estarían cumpliendo un papel importante en la regulación de los PDs (Benitez-Alfonso et al., 2009; Benitez-Alfonso and Jackson, 2009; Kim et al., 2002; Stonebloom et al., 2009). Las ROS afectan el transporte a través de los PDs tanto positivamente como negativamente. Una explicación posible es que diferentes grados de aumento en el contenido de ROS pueden ejercer efectos opuestos sobre la maquinaria reguladora de los PDs (Ueki et al., 2011).

3.2. Movimiento viral intracelular: ‘*Plasmodesmata targeting*’

Luego de la entrada en una célula vegetal, un virus debe replicarse y desplazarse a la periferia celular para transferir sus ácidos nucleicos y/o proteínas a las células adyacentes. Para muchos virus, la replicación ocurre en las membranas celulares (Netherton et al., 2007; Sanfaçon, 2005). Algunos virus a DNA se replican dentro del núcleo (Gutierrez, 1999; Lazarowitz et al., 2004), mientras que otros lo hacen en inclusiones citoplasmáticas que contienen tanto factores virales como celulares. Sin embargo, independientemente de dónde se

produzca la replicación, un virus debe moverse desde el sitio de replicación hacia las células circundantes para garantizar una infección exitosa.

Mediante ensayos de FRAP (*Fluorescent recovery after photobleaching*) se estableció que moléculas de hasta 500 kDa pueden difundirse libremente dentro del citoplasma (Luby-Phelps, 2000; Seksek et al., 1997). De esta forma, las MPs podrían llegar a los PD por difusión y posterior anclaje mediado por receptores específicos. Sin embargo, se presume que los complejos de ribonucleoproteínas virales (vRNP) y las partículas virales que son mucho más grandes, requieren mecanismos de compartimentalización y transporte específicos que aseguren su ensamblado y posterior transporte al poro de los PDs.

Por ensayo de doble híbrido, Lewis y Lazarowitz (2010) encontraron que una sinaptotagmina de *Arabidopsis* (SYTA), un sensor de calcio que regula la endo/exocitosis de las vesículas, interacciona con las MPs de TMV y de *Cabbage leaf curl virus*. En plantas de *Arabidopsis* SYTA mutantes, la infección sistémica se retrasa y se inhibe la diseminación intercelular de la MP (Lewis and Lazarowitz, 2010). Los autores plantean la hipótesis de que las MPs son dirigidas a vesículas endosómicas mediante interacción con SYTA y que estas vesículas depositan a continuación la MP en el PD para el movimiento intercelular. Una vía endocítica similar se ha propuesto para las proteínas de *Potato mop-top virus* (PMTV) (Haupt et al., 2005a). En contraste, más recientemente se ha demostrado una vía exocítica que utiliza TuMV para dirigir sus proteínas de movimiento a los PDs (Wei et al., 2010). Por ensayos de doble híbrido de levadura, se encontró interacción entre la MP de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) con la proteína de *Arabidopsis* At-4/1. El complejo NSm.At-4/1 se localiza en PD y es capaz de moverse célula a célula (Paape et al., 2006). Las PDLPs son otra familia de proteínas celulares que se localizan en PD e interaccionan con una MP formadora de túbulos. Amari et al. (2010) demostraron que las PDLPs son importantes para la formación de túbulos de la MP 2B de GFLV y que mutantes de PDLP retardaban la propagación del virus (Amari et al., 2010).

Mientras que algunos virus dependen de la vía secretora para dirigirse a los PDs, otros interaccionan con el retículo endoplasmático (ER) cortical y el citoesqueleto asociado para propagar la infección.

3.2.1. El rol de los microtúbulos

La mayoría de los estudios iniciales sobre el movimiento intracelular de los virus de plantas se enfocaron en la interacción de la MP de TMV con los microtúbulos (Heinlein et al., 1995; McLean et al., 1995; Padgett et al., 1996). Trabajos recientes han sugerido que la dinámica de los microtúbulos en el frente de infección puede impulsar el movimiento de la MP a los PD,

posiblemente en asociación con el RNA viral (Boyko et al., 2007; Brandner et al., 2008; Ouko et al., 2010; Sambade et al., 2008). En apoyo con esta idea, se ha observado que mutantes de tabaco defectuosos en la dinámica de microtúbulos son menos susceptibles a la infección por TMV (Ouko et al., 2010). Así mismo, la inhibición de la polimerización de los microtúbulos reduce el movimiento intracelular de la MP de TMV (Sambade et al., 2008). Sin embargo, hay reportes que cuestionan la importancia de los microtúbulos para el movimiento de TMV. Por ejemplo, la interrupción de la estructura y polimerización de los microtúbulos mediante tratamiento con inhibidores o por silenciamiento del gen de la tubulina, no tuvo ningún efecto negativo en la propagación del TMV (Gillespie et al., 2002; Kawakami et al., 2004). La propagación del virus tampoco disminuyó por mutantes de la MP que tenían una afinidad reducida por los microtúbulos (Gillespie et al., 2002). Aunque muchas otras proteínas virales también se asocian con los microtúbulos, aún no hay evidencias claras de que tal interacción sea crítica para el movimiento viral (Benitez-Alfonso et al., 2010; Harries et al., 2010). Por ejemplo, trabajos recientes demostraron que la proteína TGB1 de PMTV, interacciona con los microtúbulos, sin embargo, esta asociación sólo se observó en las células por detrás del frente de infección y el crecimiento de la lesión no se inhibió por el tratamiento con inhibidores de microtúbulos, sugiriendo que la interacción entre TGB1 y los microtúbulos no es necesaria para la propagación del virus (Wright et al., 2010).

3.2.2. La participación de los microfilamentos de actina

Varios estudios recientes han demostrado la participación de los microfilamentos de actina en el movimiento intracelular de algunos virus. Por ejemplo, los complejos virales de replicación (VRCs) formados en células infectadas por TMV se localizan y circulan a lo largo de los microfilamentos (Liu et al., 2005). Los VRCs se han observado en la periferia celular, lo que sugiere que se mueven a lo largo de los microfilamentos para depositar en los PD los componentes virales necesarios para el transporte intercelular (Kawakami et al., 2004). Aunque el rol de los VRCs en el movimiento intercelular sigue siendo especulativo, esta idea es apoyada por el hallazgo de que los microfilamentos intactos son necesarios para la diseminación intercelular de TMV (Harries et al., 2009b; Kawakami et al., 2004). Sin embargo, cabe señalar que existen evidencias contradictorias que sugieren que los microfilamentos no son necesarios para la propagación de TMV (Hofmann et al., 2009). Además de los VRC de TMV, tanto los complejos de replicación de *Turnip mosaic virus* (TuMV) como las inclusiones de la P6 de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) pueden moverse a lo largo de los microfilamentos (Cotton et al., 2009; Harries et al., 2009a).

A su vez, el movimiento de estos componentes virales a lo largo de los filamentos de actina sugiere la participación de las miosinas, una gran superfamilia de motores moleculares asociados a los microfilamentos. En los últimos años se ha comenzado a explorar la importancia de las miosinas en el movimiento viral (Avisar et al., 2008a; Avisar et al., 2008b; Harries et al., 2009b; Prokhnevsky et al., 2005). La utilización por parte de los virus de plantas del sistema actina-miosina para el desplazamiento intracelular sería bastante única, ya que los virus animales utilizan principalmente los microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas (las kinesinas), para el movimiento intracelular (Greber and Way, 2006).

3.3. Movimiento viral intercelular

Se distinguen dos tipos de tráfico intercelular a través de los PDs: dirigido y no dirigido (Zambryski and Crawford, 2000). El movimiento no dirigido se asemeja a la difusión pasiva y se rige por el SEL endógeno del PD involucrado, la disponibilidad de proteínas, y posiblemente las características bioquímicas de la molécula que se está transportando (Crawford and Zambryski, 2000; Roberts and Oparka, 2003; Wu et al., 2003; Zambryski and Crawford, 2000). Por el contrario, el movimiento dirigido implica interacciones específicas entre las macromoléculas transportadas y los componentes del PD que conducen a un aumento en el SEL, y por lo tanto, no está limitado por el SEL endógeno de una célula dada (Wu et al., 2003). El movimiento dirigido se da en moléculas específicas e implica un proceso activo, dependiente de energía, que las dirija a través de los PD (Roberts and Oparka, 2003; Zambryski and Crawford, 2000). Ejemplos de este mecanismo lo constituyen las MPs virales, como por ejemplo la MP^{TMV}, que interactúa directamente con los PDs (Atkins et al., 1991; Ding et al., 1992; Oparka et al., 1997; Tomenius et al., 1987) y facilita la diseminación célula a célula del RNA viral a través de los PDs (Citovsky et al., 1990; Citovsky et al., 1992; Kotlizky et al., 2001; Oparka et al., 1999).

Si bien es común que se haga una distinción entre el movimiento intracelular y el movimiento intercelular, a veces puede ser difícil separarlos. Dado que la red de ER se extiende desde el citoplasma, a través de los PDs y hacia la siguiente célula, un virus puede utilizar esta red para el transporte intra e intercelular. Sin embargo, a pesar de esta continuidad, el SEL de los PDs proporciona una barrera física que debe ser superada por los virus para pasar con éxito de una célula a otra. Las MPs virales son las encargadas de aumentar el SEL (Harries and Nelson, 2008; Waigmann et al., 2004b).

3.3.1. Proteínas de movimiento viral: *'The keys to unlock the door'*

El potencial de propagación de un virus determinado es un factor importante que determina su virulencia y patogenicidad. Para adaptarse a las plantas como hospedantes, los virus han necesitado evolucionar para adquirir la capacidad de modificar los PDs. Para esto, los virus de plantas han adquirido uno o más genes que codifican proteínas de movimiento, que facilitan el transporte célula a célula a través de los PDs (Ding et al., 1995; Fujiwara et al., 1993; Lucas et al., 1993; Oparka et al., 1997; Roberts et al., 2001). Una característica distintiva de las MPs virales es su capacidad de manipular el mecanismo que determina el SEL y aumentar la apertura de los PDs, incluso en las hojas maduras.

Las MPs se definen clásicamente como factores codificados por los virus de plantas que interaccionan con los PDs para mediar la propagación intercelular de la infección viral. Clásicamente, el término MP se ha usado para proteínas que son necesarias para la propagación de infecciones, pero que tienen poco impacto en la replicación en células individuales cuando se mutan. Si bien todos los virus de plantas codifican MPs, no existe una gran similitud de secuencia entre MPs pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (Cheng et al., 1998; Waigmann et al., 2004b). A pesar de las similitudes funcionales de las MPs, cada vez hay más pruebas de que las sutilezas del mecanismo de movimiento de cada virus pueden ser diferentes, incluso entre virus muy estrechamente relacionados (Scholthof, 2005; Waigmann et al., 2004b). La naturaleza multifuncional de las proteínas virales también implica que las MPs pueden mostrar funciones alternativas; como por ejemplo, actividad supresora de silenciamiento (Bayne et al., 2005).

El hallazgo de que las MPs virales compiten con proteínas endógenas por la maquinaria celular encargada del transporte célula a célula, apoya la hipótesis de que los genes de las MPs fueron adquiridos del genoma de la planta (Kragler et al., 1998). Además, como los PDs se encargan del transporte selectivo de moléculas regulatorias, la competencia entre las MPs y tales moléculas de la planta, podría explicar algunos aspectos del desarrollo de síntomas como respuesta a las infecciones virales.

Las MPs virales pueden dividirse en tres clases generales basadas en sus propiedades funcionales: 1) MPs que muestran propiedades de unión a RNA y median la translocación de las ribonucleoproteínas virales (vRNP) sin reorganización estructural de los PDs; 2) MPs que generan una reorganización estructural del canal del PD mediante la formación de túbulos que proporcionan el conducto para el movimiento célula a célula de partículas virales o vRNP ; y 3) un grupo de proteínas definidas genéticamente como MPs pero que tienen funciones más relacionadas con el tráfico intracelular de componentes virales a los PDs y pueden o no mostrar capacidad de unión a ácidos nucleicos virales.

De manera más sistemática, las MPs pueden dividirse en varios grupos evolutivos basados en sus propiedades funcionales y estructuras secundarias predichas (Melcher, 2000). Esta clasificación será abordada en el Capítulo 1.

3.3.2. Estrategias virales de movimiento vía plasmodesmos

Los virus y sus MPs han evolucionado y desarrollado diferentes mecanismos de transporte intracelular y de interacción con los PDs. Algunos virus se mueven célula a célula por interacción con mecanismos celulares que controlan el SEL de los PDs, mientras que otros alteran la arquitectura de los PDs a través del ensamblado de estructuras de transporte especializadas dentro del canal. Así mismo, algunos virus se mueven entre las células en forma de partículas virales, mientras que otros pueden interaccionar con los mecanismos de transporte de los ácidos nucleicos para mover sus genomas en forma no encapsidada.

Es importante recordar que incluso los genomas virales desnudos tienen un diámetro efectivo demasiado grande para pasar a través de los PDs. De este modo, una de las funciones clave de la MP viral es agrandar los PD para permitir el paso del virus a la célula adyacente (Wolf et al., 1989). Las MPs también desempeña un papel activo, aunque menos definido, en el movimiento físico del virus a través del PD. Como se mencionó anteriormente, las MPs de los virus de plantas se pueden dividir en dos grandes categorías, basadas en el grado de cambios estructurales que inducen en el PD y la forma del complejo ácido nucleico-proteína viral que viaja a través del PD (Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011; Scholthof, 2005). En la Figura 13 se muestra un esquema de los diferentes modelos propuestos para el movimiento de los virus a través de los PD.

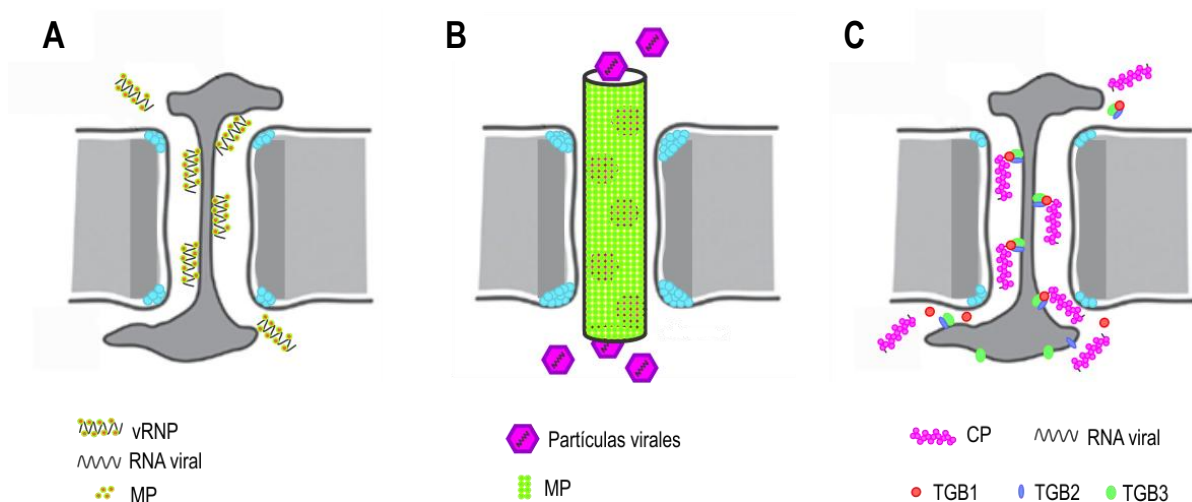


Figura 13. Modelos de movimiento viral vía plasmodesmos. A) Modificación de los PDs por virus que se mueven de una célula a otra en forma no encapsidada. Las MP de estos virus causan un aumento en el SEL del PD a menudo relacionado con la degradación de la calosa asociada al PD, pero también puede implicar un papel de la actina. Los complejos de

ribonucleoproteínas virales (vRNP) atraviesan el canal del PD probablemente en asociación con la membrana del desmotúbulo. B) Modificación del PD por virus que forman túbulos. El túbulo se forma con la MP viral y permite el movimiento entre las células de partículas virales enteras. Dado que el túbulo reemplaza al desmotúbulo, este tipo de movimiento interrumpe la continuidad entre las células de ER. C) Modelo propuesto para el movimiento de *Potexvirus*.

Los siguientes párrafos describen diferentes mecanismos mediados por las MPs por los cuales los virus alcanzan los PDs y se mueven a través de ellos.

Virus que se mueven sin la formación de túbulos

A diferencia de los virus que forman túbulos, la mayoría de los virus de plantas se mueven a través de los PDs sin inducir grandes cambios estructurales en la arquitectura del canal (Figura 13 A y C). Esta forma de movimiento debe estar asociada con partículas infecciosas y mecanismos de movimiento que se adapten a la estructura y función de los PDs. Además, es probable que dependan de mecanismos celulares existentes para el transporte de macromoléculas. Como consecuencia de dicha adaptación, la mayoría de los virus que no dependen de una MP formadora de túbulos, desarrollaron mecanismos para moverse de célula a célula en forma no encapsidada.

El mecanismo mediante el cual las MPs de virus que no forman túbulos manipulan el SEL de los PDs tampoco se conoce. Dado que varias proteínas vegetales endógenas son capaces de modificar el SEL y de moverse célula a célula como las MPs (Lucas et al., 2009), las MPs probablemente interaccionan con mecanismos endógenos y factores celulares del hospedante para el transporte intercelular. Una hipótesis de cómo estas MPs pueden mover el genoma viral a través de los PDs es que las MPs y otros factores *non-cell-autonomous* pueden causar un cambio en los niveles locales de Ca^{+2} , lo cual se sabe que afecta el SEL de los PDs (Baluska et al., 1999; Baron-Epel et al., 1988; Holdaway-Clarke et al., 2000; Lew, 1994; Tucker, 1990; Tucker and Boss, 1996; Yaholom et al., 1998). Las MPs también podrían causar un consumo local de ATP (algunas MPs han mostrado unión a nucleótidos), que también causa dilatación de los PDs (Cleland et al., 1994; Tucker, 1993). Estudios más recientes indican que las MPs de CMV y TMV tienen actividad de corte de actina F y que esta actividad es necesaria para incrementar el SEL (Su et al., 2010). Estas MPs también pueden dilatar los PDs a través de la degradación de los depósitos de calosa presentes en los PDs.

El movimiento viral a través de los PDs puede requerir también de la asistencia de chaperonas específicas. Esta hipótesis es apoyada por un estudio que sugiere que el transporte a través de los PDs puede implicar el desplegado de proteínas (Kragler et al., 1998) y por la observación de que las células en el frente de la infección sufren una inducción transitoria de la expresión

de Hsp70 (Havelda and Maule, 2000; Whitham et al., 2003). El closterovirus *Beet yellows virus* (BYV) expresa un homólogo de Hsp70 requerido para el movimiento, el cual se cree que facilita el movimiento del virus uniéndose a un receptor de PD y a un dominio de la cápside viral (Alzhanova et al., 2001). Finalmente, estas MPs pueden regular el SEL por interacción o reclutamiento de proteínas receptoras específicas. La proteína de Tabaco NtNCAPP1 interacciona con la MP de TMV y con varias NCAPs. La presencia de un mutante NtNCAPP1 interfiere con la capacidad de la MP de TMV para aumentar el SEL de los PDs (Lee et al., 2003; Taoka et al., 2007).

Virus que se mueven a través de túbulos en los PDs

Los virus que se mueven célula a célula en forma de viriones encapsidados se encuentran con el problema de que el tamaño de las partículas de virión (generalmente > 10 nm) excede el diámetro del canal citoplasmático de los PDs (la manga citoplasmática tiene un máximo de 10nm de diámetro). Como resultado, los virus adoptaron estrategias drásticas para permitir que las partículas pasen a través del poro. Estos virus codifican MPs capaces de montar una estructura de transporte en forma de túbulos dentro de los PDs (Kasteel et al., 1996; van Lent et al., 1991; van Lent and Schmitt-Keichinger, 2006) (Figura 13 B). Este transporte guiado por túbulos implica la modificación estructural de los PD, que consiste en la eliminación del desmotúbulo (Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011) y un incremento efectivo del SEL desde 5 hasta 50 nm (Kitajima and Lauritis, 1969; Lucas et al., 1993; van der Wel et al., 1998). La eliminación del desmotúbulo indica que el sistema de endomembranas no está implicado en el transporte intercelular de estos virus, aunque puede ser necesario para el movimiento intracelular desde el sitio de ensamblado del virión hasta el túbulo.

Si bien no se conoce el mecanismo molecular del transporte guiado por túbulos, algunas MPs de estos virus interactúan con su respectiva CP, usualmente por el extremo C-terminal de la MP. Por ejemplo, el extremo C-terminal de la MP de CPMV se encuentra en el interior del túbulo (van Lent et al., 1991), en estrecha proximidad a la partícula viral cuando pasa a través de éste. Consistentemente, la delección del extremo C-terminal de esta MP interfiere con la captación de viriones en el túbulo, llevando a la observación de túbulos "vacíos" (Lekkerkerker et al., 1996). Interacciones específicas entre los túbulos y los viriones a través del extremo C-terminal de la MP también se han observado con el virus GFLV (Belin et al., 1999). Se ha demostrado para varios virus, entre ellos CaMV, TSWV, CPMV (cowpea mosaic virus) y GFLV, que sus MPs son necesarias y suficientes para la formación de estas estructuras tubulares (Perbal et al., 1993; Ritzenthaler et al., 1995; Storms et al., 1995; van Lent et al., 1991). Los géneros de virus con miembros que utilizan túbulos para el movimiento intercelular incluyen los

géneros *Caulimovirus*, *Comovirus*, *Tospovirus*, *Bromovirus* y *Nepovirus* (Kasteel et al., 1997; Kitajima and Lauritis, 1969; Melcher, 2000; Perbal et al., 1993; Ritzenthaler et al., 1995; Storms et al., 1995; van Lent et al., 1991).

Es posible que esta estrategia de movimiento pueda ocurrir por un proceso dinámico similar al *treadmilling* de microtúbulos y actina, en el que el ensamblado de monómeros en un extremo del túbulo se equilibra por desensamblado en el otro extremo. Teniendo en cuenta la afinidad de las MPs por sus CP, los complejos MP-virión pueden ensamblarse en la base del túbulo de la célula infectada y ser transportados a través de los PDs a través del *treadmilling* de túbulos, y luego ser liberados en la célula adyacente por desensamblaje (Niehl and Heinlein, 2011).

Hay evidencias que sugieren que estos virus se mueven a través de PDs no ramificados. Además, se ha observado un aumento en el número de PDs en el frente de infección de estos virus (van der Wel, 2000). Sin embargo, queda aún por establecerse, si los túbulos también pueden formarse mientras se están desarrollando PDs nuevos en lugar de ocurrir una modificación de los PDs existentes no ramificados.

Virus que se mueven como vRNP

La mayoría de los virus que no forman túbulos codifican MPs que forman vRNPs con vRNA y facilitan la propagación intercelular de estos complejos de vRNPs por interacción con la maquinaria celular que se encarga del transporte de macromoléculas y de la regulación del SEL de los PD. Este tipo de movimiento puede ser independiente de la CP, como en el caso de TMV (Holt and Beachy, 1991), o puede requerir de la CP como por ejemplo, en el caso de los bromovirus *Brome mosaico virus* (BMV) y CMV (Kim et al., 2004; Nagano et al., 2001; Sasaki et al., 2005) o los potexvirus (Verchot-Lubicz et al., 2007) (Figura 13 C). Sin embargo, aunque la CP de TMV es dispensable para el movimiento local del virus, es necesaria para el movimiento a larga distancia a través del floema (Holt and Beachy, 1991). Al igual que para muchos otros virus, este requisito de la CP para el movimiento a larga distancia no necesariamente puede reflejar un requisito de formación de virión, pero puede indicar el requisito de la estabilización adicional de la vRNP para la entrada o el movimiento a través de la vasculatura (Hipper et al., 2013).

Los bromovirus BMV y CMV se mueven célula a célula como una vRNP y también necesitan de la CP para la propagación; sin embargo, la CP tiene funciones auxiliares, ya que se ha demostrado que mutaciones específicas en la MP permiten que estos virus se muevan sin la CP (Andreev et al., 2004; Kim et al., 2004; Nagano et al., 2001; Sasaki et al., 2005). Se demostró que una delección del extremo C-terminal de la MP de CMV aumenta la estabilidad de

las vRNPs (Andreev et al., 2004; Kim et al., 2004) y permite una infección independiente de la CP (Nagano et al., 2001). Esto sugiere que la necesidad de la CP para el movimiento puede estar relacionada con la afinidad de la MP por el RNA viral. Por lo tanto, las MPs que se unen fuertemente a su RNA como el caso de la MP de TMV hacen que la CP sea innecesaria, sin embargo, las MP que se unen débilmente a su RNA, como el caso de CMV (Li and Palukaitis, 1996), requieren de la CP, lo que indica que el RNA necesita encapsidarse para el movimiento (Lucas, 2006).

Una hipótesis interesante es que los virus pueden cambiar sus estrategias de movimiento en función de la especie de hospedante que esté infectando o por parámetros ambientales. Las MPs de virus formadores de túbulos forman estructuras de tipo túbulo cuando se expresan en protoplastos (por ejemplo, véase van Lent et al., 1991). Curiosamente, se forman estructuras aparentemente similares en los protoplastos infectados con TMV, lo que sugiere que incluso TMV, que como ya se mencionó es el modelo de virus que se mueven por una estrategia no guiada por túbulos, puede tener la opción para diferentes estrategias de movimiento (Heinlein et al., 1998). Las propiedades bioquímicas comunes y las estrategias de movimiento flexibles pueden contribuir a la capacidad de las MPs para complementar el movimiento deficiente de virus no relacionados (Lewandowski and Adkins, 2005; Morozov et al., 1997; Rao et al., 1998; Sánchez-Navarro et al., 2006; Tamai et al., 2003).

3.3.3. Regulación del movimiento viral a través de los PDs

Probablemente, como un medio para minimizar el daño ocasionado al hospedante por la dilatación (*gating*) permanente de los PDs, la actividad de las MPs se controla en varios niveles. Por ejemplo, la MP de TMV sólo se sintetiza transitoriamente durante las primeras etapas de la infección (Blum et al., 1989; Watanabe et al., 1984) y se degrada por el proteasoma 26S (Reichel and Beachy, 2000). El cese de la expresión de MP y la degradación de las MP remanentes, conduce a la desaparición de la proteína varias células detrás del frente de infección, dando a los sitios de infección un patrón en forma de anillo si la MP se fusiona con proteínas fluorescentes (Heinlein et al., 1995; Heinlein et al., 1998; Hofmann et al., 2009; Padgett et al., 1996; Szécsi et al., 1999). Por otra parte, el *gating* de PDs durante la infección por TMV se limita al frente de infección, aunque los PDs de las células centrales de los sitios de infección siguen siendo marcados con MP:GFP (Oparka et al., 1997). Esto indica que la MP se vuelve no funcional para el *gating* de PDs después de que el virus se haya diseminado. La capacidad de la MP para dilatar los PDs disminuye después de la fosforilación (Trutnyeva et al.,

2005; Waigmann et al., 2000) por una quinasa asociada a la pared celular (Citovsky et al., 1993). Por lo tanto, otro nivel de regulación sería la inactivación de la función de las MPs a través de la fosforilación por una quinasa localizada en los PDs.

HIPÓTESIS GENERALES

- Las proteínas de movimiento de los ophiovirus pertenecen a un grupo aislado de proteínas de movimiento viral célula a célula.
- La proteína MP de CPsV contiene determinados dominios proteicos responsables de su localización subcelular y de la función de movimiento viral y supresión del silenciamiento génico.
- La proteína 24K de CPsV contiene dominios funcionales responsables de su localización subcelular y de su actividad como proteína supresora del silenciamiento génico.
- La proteína MP de CPsV interviene en el movimiento viral a larga distancia.
- La MP de CPsV interacciona con varias proteínas del hospedante para cumplir con sus funciones en el ciclo viral.

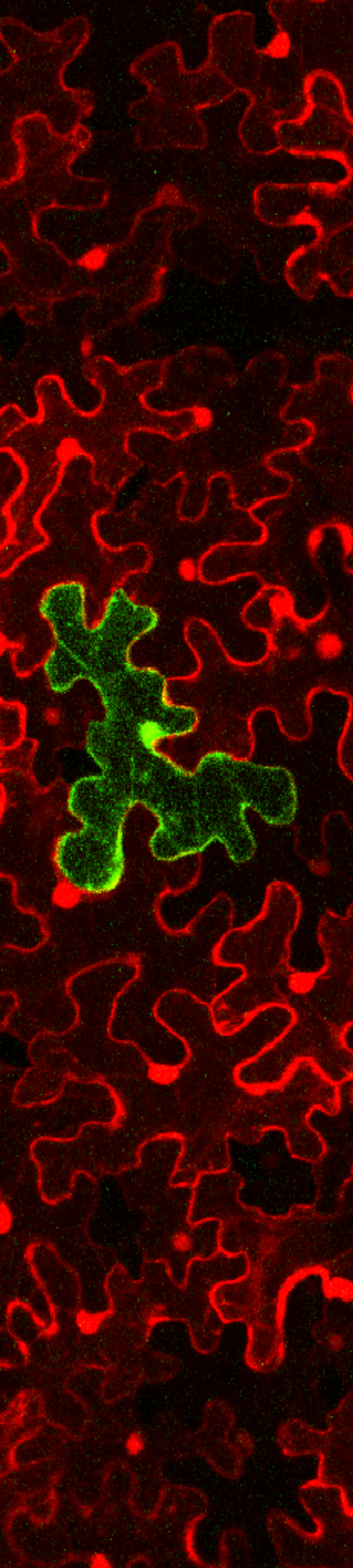
OBJETIVOS GENERALES

El conocimiento de los mecanismos utilizados por los virus para propagarse, y en particular de nuevas familias de virus, contribuyen al descubrimiento de los principios básicos de la biología de virus de plantas y la interacción que ocurre entre ellos.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se propuso avanzar en la caracterización estructural y funcional de las proteínas de movimiento de los ophiovirus CPsV y MiLBVV, caracterizando sus dominios funcionales involucrados en el movimiento viral célula a célula. También se planteó identificar la/las proteínas de CPsV involucradas en el movimiento viral a larga distancia, así como los factores celulares que interaccionan con la proteína de movimiento de CPsV durante el ciclo viral.

A continuación se detallan los objetivos específicos que se plantearon para abordar este análisis:

1. Realizar un análisis bioinformático exhaustivo de las proteínas de movimiento célula a célula de los ophiovirus, con el fin de determinar posibles dominios y/o motivos funcionales presentes en sus secuencias.
2. Estudiar los dominios determinantes de la localización subcelular de las proteínas 24K y MP^{CPsV}, mediante expresión transitoria de mutantes *in planta*.
3. Determinar los dominios funcionales de la proteína 54K involucrados en la función de movimiento viral.
4. Determinar las proteínas de CPsV involucradas en el movimiento viral a larga distancia.
5. Caracterizar el interactoma de la proteína de movimiento de CPsV.



CAPÍTULO 1

La proteína de movimiento de los ophiovirus pertenece a la superfamilia 30K de proteínas de movimiento viral

INTRODUCCIÓN

1. La superfamilia 30K

Las MPs pueden dividirse en varios grupos evolutivos basados en sus propiedades funcionales y en sus estructuras secundarias predichas (Melcher, 2000). Actualmente se agrupan en cuatro clases estructurales, de las cuales la más grande es el grupo de la superfamilia 30K, formada por miembros estructuralmente relacionados con la proteína de movimiento de 30 kDa de TMV (Koonin et al., 1991; Melcher, 2000; Mushegian and Koonin, 1993).

Homólogos de la MP 30K de TMV, con diversos grados de similitud de secuencia, continúan siendo descubiertos en varios virus a DNA y RNA de plantas, siendo los virus con genomas a RNA de doble hebra los únicos que hasta el momento no se ha probado que codifiquen homólogos de esta familia.

El origen evolutivo de la superfamilia 30K continúa siendo un misterio, debido a que aún no han sido caracterizadas las estructuras terciarias de sus miembros y a que parece no haber homólogos de la familia fácilmente reconocibles fuera de los virus de plantas (Mushegian and Elena, 2015).

Si bien se desconocen los mecanismos de acción, el análisis molecular de diferentes miembros de la superfamilia 30K ha revelado muchas propiedades de estas MPs que son potencialmente relevantes para los mecanismos de propagación viral célula a célula. Estas propiedades incluyen la capacidad de: 1) unir RNA y DNA monocatenario de manera cooperativa y no específica (Karpova et al., 2006; Lough et al., 2000; Shemyakina et al., 2011); 2) localizarse y acumularse en PDs (Ding et al., 1992; Lucas, 2006; Niehl and Heinlein, 2011); 3) inducir el incremento del SEL de los PDs; y 4) facilitar tanto su propio tráfico intercelular como de macromoléculas heterólogas (Su et al., 2010; Vogler et al., 2008; Waigmann and Zambryski, 1995; Wolf et al., 1989).

La superfamilia 30K es la familia de genes de virus de plantas con la más amplia distribución filogenética. Por lo tanto, el descubrimiento de miembros cada vez más diversos ha dificultado la identificación de grandes regiones de similitud de secuencia que sean compartidas por todos los miembros de la superfamilia. Esta baja conservación de secuencia sugiere que sus miembros podrían tener una estructura tridimensional común, eclipsada por la gran divergencia de secuencia. De hecho, se ha podido caracterizar un dominio central muy conservado en estructura secundaria que es compartido por todos sus miembros. Este dominio consiste en una α -hélice separada por siete cadenas- β (Melcher, 2000; Mushegian and Elena, 2015; Yu et al., 2013). La única porción de secuencia común en todas las MPs 30K es una pequeña región entre las cadenas- β 1 y - β 2, la cual contiene varios residuos hidrofóbicos conservados y un

ácido aspártico casi invariante ('motivo D') el cual constituye la "secuencia *signature*" de la superfamilia (Melcher, 2000; Mushegian and Koonin, 1993; Yu et al., 2013). Este aspartato parece ser necesario para la actividad de movimiento de las MPs 30K (Bertens et al., 2000; Li et al., 2009; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2012), sin embargo, aún se desconoce su función molecular. En el caso de *Alfamovirus*, *Dianthovirus* y *Torradovirus*, el ácido aspártico es sustituido por asparagina y se alinea con un residuo aromático en *Nepovirus*. En este último caso, sin embargo, se encuentra un residuo de ácido aspártico cinco residuos más delante en la secuencia, que se sospecha que puede ser el equivalente funcional del 'motivo D' en los *Nepovirus* (Mushegian and Elena, 2015).

2. Estudio de la función génica en virus a RNA negativos

La genética reversa, es decir, la posibilidad de sintetizar *in vitro* genomas virales derivados de cDNAs clonados o de transcritos de sus genomas, es una poderosa herramienta para el estudio de la biología de los virus de plantas, ya que permite manipular genéticamente sus genomas. Sin embargo, en el caso de virus cuyo genoma es a RNA negativo, que necesitan de la polimerasa viral para iniciar la síntesis de sus genomas, se presenta gran dificultad para generar clones virales infectivos, por lo que esta estrategia no suele estar al alcance de estos virus de plantas. Hasta el momento, el estudio funcional de los virus a RNA negativos se limita al análisis de sus proteínas aisladas y al uso de vectores virales que permitan estudiar las funciones de las mismas en el contexto de una infección.

En la actualidad, las estrategias más usadas para determinar las funciones de los genes que codifican las MP en virus negativos, se basan en ensayos de complementación de función en *trans* (transcomplementación), donde se utilizan virus con genoma a RNA de polaridad positiva defectivos en la función en estudio. Los virus positivos más utilizados en estos ensayos son PVX y TMV (Huang et al., 2005; Li et al., 2004; Morozov et al., 1997; Xiong et al., 2008). Un ejemplo interesante de transcomplementación lo constituye la MP de TSWV, un virus negativo que se mueve a través de túbulos en los PDs. Si bien, como ya se mencionó, el mecanismo de movimiento de TMV no utiliza la formación de túbulos en los PDs, la MP^{TSWV} (que forma túbulos) es capaz de facilitar el movimiento tanto célula a célula como a larga distancia de un TMV defectivo en su MP^{TMV} (Lewandowski and Adkins, 2005).

HIPÓTESIS

- Las MPs de los ophiovirus pertenecen al grupo de la superfamilia 30K de proteínas de movimiento viral.
- Las MP 54K de CPsV y 55K de MiLBVV contienen el 'motivo D' característico de la familia 30K.
- El 'motivo D' presente en las MP de CPsV y MiLBVV es determinante de sus funciones como proteínas de movimiento viral.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un vector viral basado en TMV compatible con el método de agroinfiltración para el estudio del movimiento viral célula a célula.
2. Caracterizar mediante análisis bioinformático la organización estructural de las MP de los ophiovirus.
3. Desarrollar construcciones génicas que permitan la expresión de las MP de CPsV y MiLBVV mutantes en el motivo D, fusionadas traduccionalmente a distintos genes reporteros fluorescentes
4. Determinar la función del motivo D, en las capacidades de las MP de CPsV y MiLBVV para:
 - 4.1 Localizarse y acumularse en PDs
 - 4.2 Incrementar el SEL de los PDs
 - 4.3 Complementar el movimiento de un mutante de TMV incapaz de moverse célula a célula

RESULTADOS

1. Construcción de un nuevo vector viral basado en TMV compatible con la agroinfiltración para el estudio del movimiento viral célula a célula y optimización del ensayo de infección

La mayoría de los vectores actuales basados en TMV que se utilizan para estudiar el movimiento intercelular requieren la generación previa *in vitro* de transcritos con estructura 5'cap, que son usados como inóculo para la infección de la planta hospedante, mediante inoculación mecánica de hojas (Pogue et al., 1998). En particular, los pasos de transcripción *in vitro* y de inoculación mecánica, aumentan significativamente el costo y la complejidad del uso de este tipo de vectores debido a la inestabilidad del RNA y por ende, de las cantidades de RNA requeridos para la inoculación. Por el contrario, la agroinfiltración (Grimsley, 1995; Grimsley et al., 1986) es una estrategia menos costosa y más reproducible para infectar plantas con virus a RNA. Por lo tanto, nos propusimos crear un nuevo vector viral basado en TMV deficiente en el movimiento célula a célula, que pueda ser complementado en *trans* por MPs heterólogas, pero que la inoculación pueda realizarse por agroinfiltración.

1.1. Desarrollo del vector viral TMV Δ MP Δ CP:GFP compatible con la agroinfiltración

Se generó el mutante TMV Δ MP Δ CP-GFP que no expresa su MP ni su CP, pero que expresa la proteína reportera GFP bajo el promotor subgenómico de la CP (Figura 14 C). El vector viral TMV Δ MP Δ CP-GFP se construyó partiendo del plásmido pJL-TRBO-G (TMV Δ CP-GFP) (Lindbo, 2007), el cual permite la expresión de un virus TMV mutado, que expresa la proteína reportera fluorescente GFP en lugar de la CP (Figura 14 B). La falta de la CP produce genomas virales no encapsidados incapaces de transportarse a larga distancia por el floema (Culver and Dawson, 1989; Ding et al., 1996; Holt and Beachy, 1991; Takamatsu et al., 1987). No obstante, la presencia de la MP permite el movimiento célula a célula, el cual puede ser monitoreado mediante la aparición de fluorescencia verde proveniente de la expresión de GFP. Así, la eliminación de la MP produciría virus mutantes incapaces de moverse célula a célula, pero cuyo movimiento intercelular podría ser complementado en *trans* por MPs heterólogas, como lo serían las MPs de los ophiovirus. Por lo tanto, usando una estrategia de PCR se realizó una gran deleción del gen de la MP^{TMV} del plásmido pJL-TRBO-G. Los detalles del proceso de clonado se presentan en la sección de Materiales y Métodos.

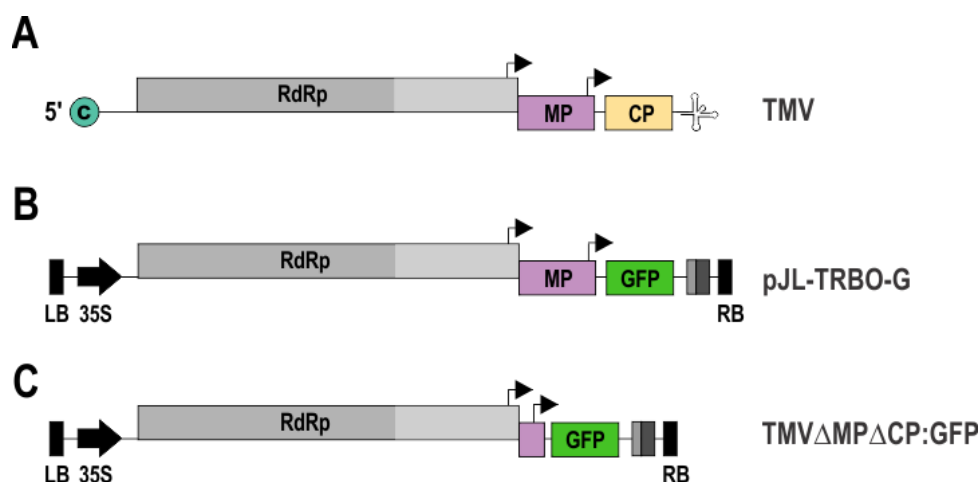


Figura 14. Representación esquemática de: A) genoma de TMV, el extremo 3' del RNA tiene una estructura *tRNA-like* y el 5' un *cap* metilado (m7G5'pppG); B) región del T-DNA del plásmido binario pJL-TRBO (Lindbo, 2007); C) región del T-DNA del vector TMVΔMPΔCP-GFP. Flecha de bloque, promotor duplicado 35S de CaMV; flechas dobladas, promotores subgenómicos; recuadro gris oscuro, señal de poliadenilación/terminador de CaMV; recuadro gris claro, ribozima. RdRP, ORF 126K/183K de TMV; LB, borde izquierdo; RB, borde derecho.

1.2. Optimización del ensayo de infección

Para la optimización del ensayo, primeramente se determinó si la expresión ectópica de la MP de TMV (MP^{TMV}) conduce el movimiento de TMVΔMPΔCP-GFP. Para ello se co-agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con un cultivo diluido de *A. tumefaciens* conteniendo el reportero TMVΔMPΔCP-GFP junto con un cultivo de *A. tumefaciens* que porta la construcción para la expresión de la MP^{TMV} fusionada a mRFP (MP^{TMV} :mRFP), o de la mRFP libre (utilizada como control negativo). Para determinar la dilución óptima que permita la expresión de GFP en focos discretos procedentes de la transformación de una única célula, se probaron diluciones $DO_{600nm} = 1 \times 10^{-4}$, 1×10^{-5} y 1×10^{-6} del cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo el reportero TMVΔMPΔCP-GFP. Luego de 5 dpai, en las hojas inoculadas con las dos diluciones mayores del reportero en conjunto con mRFP, se detectó fluorescencia de GFP sólo en células aisladas, mostrando que el virus pudo replicarse en esa única célula, pero que no es capaz de moverse a las células adyacentes. Las hojas agroinfiltradas con la dilución menor del reportero mostraron una cantidad significativa de focos fluorescentes no discretos. La dilución 1×10^{-6} del reportero, permitió la aparición de muy pocos focos fluorescentes verdes, lo que podría obstaculizar el recuento, en particular, en los casos donde se observan células aisladas individuales en lugar de focos fluorescentes de varias células. Estos resultados sugieren que una $DO_{600nm} = 1 \times 10^{-5}$ contiene el valor de densidad bacteriana apropiado para los ensayos de trans-complementación de movimiento.

Cuando se analizaron las hojas que co-expresaban TMVΔMPΔCP-GFP junto con la MP^{TMV} :mRFP, se detectaron focos de expresión de GFP en grupos de células, indicando que

TMVΔMPΔCP-GFP puede moverse eficientemente desde la célula originalmente infectada hacia las células vecinas. Estos resultados demostraron que la expresión ectópica de la MP^{TMV}:mRFP desde un vector binario es capaz de complementar el movimiento célula a célula del reportero TMVΔMPΔCP-GFP, indicando que este nuevo vector es funcional para los ensayos de complementación en *trans*.

En la Figura 15 se muestra un esquema del ensayo de infección junto con fotos representativas de los resultados obtenidos con MP^{TMV} (Figura 15B).

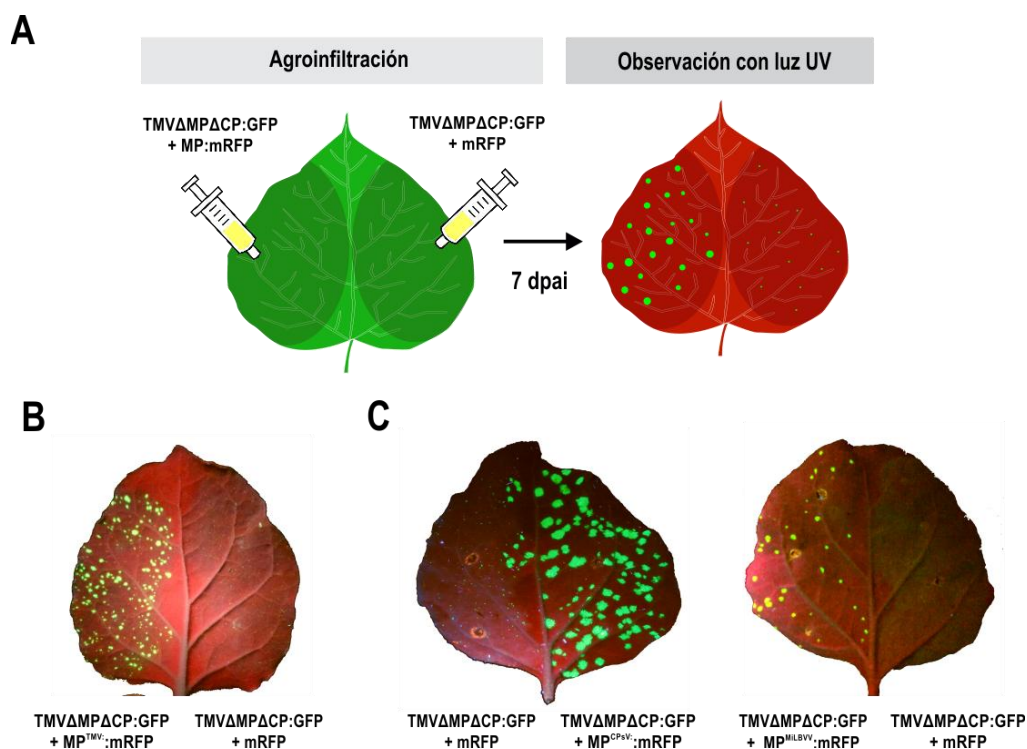


Figura 15. A) Ilustración de los ensayos de transcomplementación usando agroinfiltración. B) Imagen representativa de una hoja de *N. benthamiana* iluminada con luz U.V. coexpresando TMVΔMPΔCP-GFP y MP^{TMV}:mRFP en el lado izquierdo o mRFP en el lado derecho de la hoja a 7 dpi.

Para ajustar aún más el ensayo de trans-complementación, se realizó un seguimiento del movimiento de TMVΔMPΔCP-GFP en las hojas infiltradas a diferentes tiempos, 2 a 7 dpi, mediante observaciones por microscopía de fluorescencia y con iluminación UV con lámpara y a ojo desnudo. Así, se detectó el movimiento célula a célula de TMVΔMPΔCP-GFP a partir de 2 dpi por microscopía y a partir de los 4-5 dpi a ojo desnudo, y se observó que el vector TMVΔMPΔCP-GFP continuó moviéndose célula a célula hasta los 6-7 dpi.

Una vez optimizadas las condiciones de ensayo, se probó la trans-complementación con las MPs de CPsV y MiLBVV. Como se esperaba, las proteínas MP^{CPsV}:mRFP y MP^{MiLBVV}:mRFP también fueron capaces de facilitar el movimiento de TMVΔMPΔCP-GFP, como se ha demostrado previamente con otros dos vectores virales (Robles Luna et al., 2013) (Figura 15C).

(Biegert et al., 2006), que es más sensible y se utiliza para validar homólogos. HAlign devolvió un *E-value* estadísticamente significativo ($E=7.10^{-4}$) cuando se compararon las MPs de los ophiovirus con las MPs de la familia 3A de PFAM, demostrando que las MPs de los ophiovirus son homólogas a las MPs 30K, y por lo tanto, pertenecen a la superfamilia 30K. El análisis de la predicción de estructura secundaria de las MPs de los ophiovirus, indica que su dominio central, correspondiente a hélice αA y cadenas $\beta 1$ a $\beta 7'$, se localiza entre los aminoácidos 90 y 233 en la numeración para CPsV (ver Figura 17).

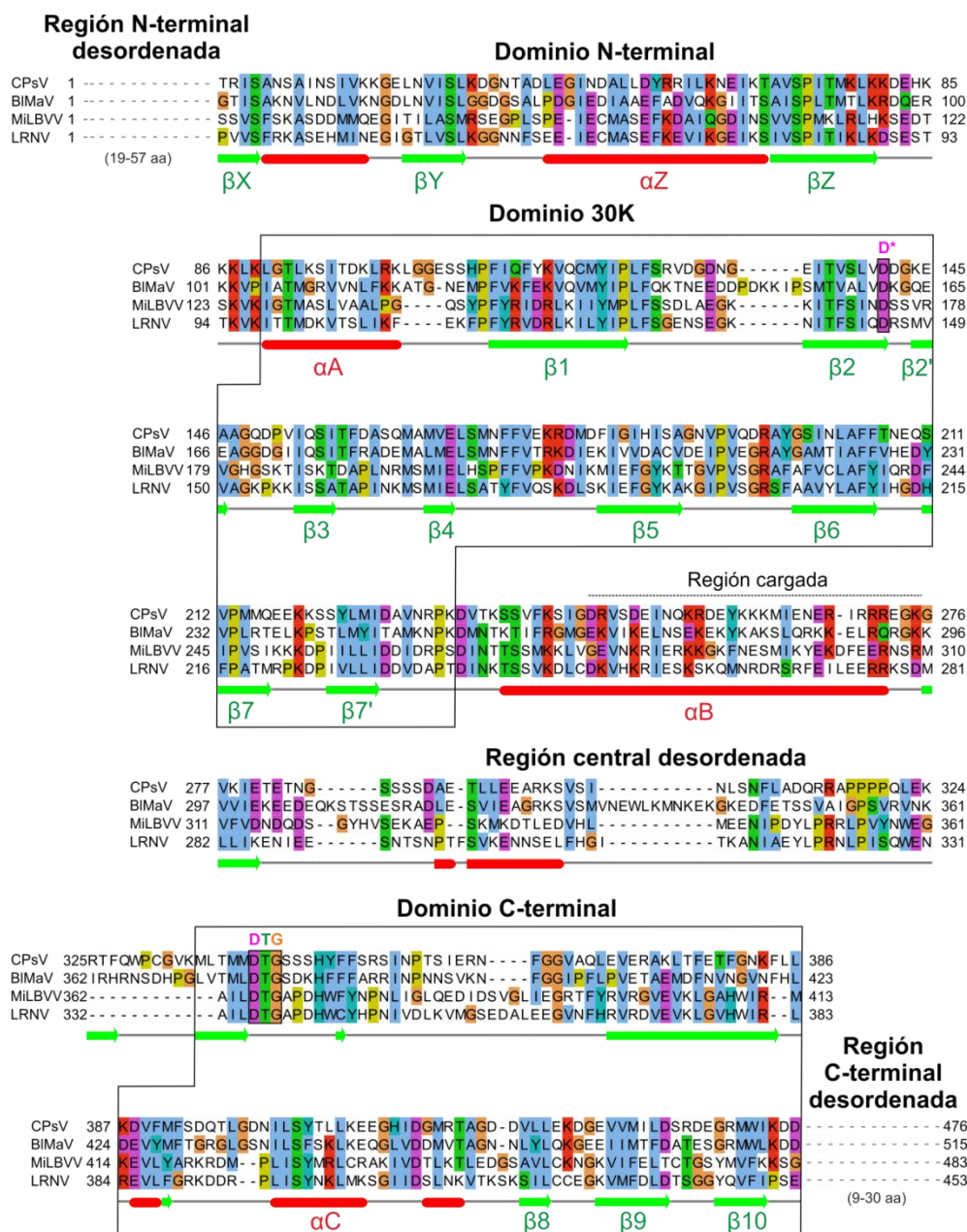


Figura 17. Alineamiento de secuencias y predicción de estructura secundaria de las MPs de ophiovirus. Las secuencias son: CPsV, número de acceso AAM47152.1; MiLBVV, número de acceso AGG54707.1, *Blueberry mosaic associated virus* (BImaV), número de acceso AIF28243.1 y *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV), número de acceso YP_053238.1). Los límites de la región central desordenada son aproximados. El residuo D del 'motivo D' (D*) aguas abajo de $\beta 2$, y el tri péptido 'DTG' en el dominio C-terminal están recuadrados.

La predicción de la organización estructural de las MPs de los ophiovirus también está representada en la Figura 17, donde se puede ver que se organizan en 6 regiones: 1) un extremo N-terminal desordenado, variable en secuencia y longitud; 2) un dominio N-terminal con conservación de secuencia (hebras β X a β Z); 3) el dominio central común a todas las MPs 30K (hélice α A y hebras β 1 a β 7'), que contiene el residuo de ácido aspártico (D*) altamente conservado en la superfamilia (recuadrado en la Figura 17); 4) una región central larga y desordenada; 5) un dominio C-terminal, conservado en estructura secundaria pero no en la secuencia primaria; y 6) un extremo C-terminal corto, variable y desordenado. La región central desordenada contiene dos partes: (i) un segmento largo con altas probabilidades de formar una α -hélice (α B), rico en residuos cargados, y (ii) una región altamente variable en secuencia aguas abajo de α B. Los primeros 35 aminoácidos del dominio C-terminal probablemente forman un *loop* altamente flexible, en vista de su variabilidad de secuencia y su baja predicción de contenido de estructura secundaria (Figura 17). Curiosamente, encontramos que el dominio C-terminal de los ophiovirus contiene un tripéptido DTG estrictamente conservado (recuadrado en la Figura 17), probablemente por motivos funcionales, más que estructurales. Así mismo, este tripéptido no se ha descrito en el extremo C-terminal de ninguna otra MP 30K.

El siguiente paso fue examinar la relación evolutiva entre las MPs de los ophiovirus y otras 30K. Para esto, se llevó a cabo una búsqueda por Psiblast con el dominio central de las MPs de los ophiovirus, sin encontrar una coincidencia estadísticamente significativa ($E < 10^{-3}$). Sin embargo, mediante Psiblast se encontró un *hit* marginal ($E=3.1$) con la proteína PC4 de *Iranian wheat stripe virus* (IWSV) (Número de acceso AAP82278.1), un *tenuivirus* cuya MP pertenece a la superfamilia 30K, con un 17% de identidad de secuencia sobre 131 aminoácidos. Por lo tanto, la falta de coincidencias significativas con las MPs de los ophiovirus en Psiblast, indica claramente que estas MPs están evolutivamente distantes de la mayoría de las otras MPs 30K.

En la actualidad, la filogenia de las proteínas altamente distantes no se puede inferir con fiabilidad, y por lo tanto no podríamos utilizar el dominio central 30K para inferir relaciones evolutivas entre la MP de los ophiovirus y otras MPs 30K. Sin embargo, se pueden usar caracteres derivados, es decir, caracteres que no son comunes a toda una familia de proteínas, para evaluar relaciones filogenéticas. De esta forma, el dominio N-terminal de la MP 30K de los ophiovirus puede considerarse ese carácter derivado. Por consiguiente, realizamos búsquedas de homología en este dominio N-terminal para determinar si podríamos identificar coincidencias con otras MPs 30K. No pudimos identificar homólogos de este dominio N-terminal, ni siquiera examinando todos los *hits* con significación marginal hasta un valor E de 10.000 usando Psiblast. Por lo tanto, la secuencia del dominio N-terminal de los ophiovirus secuenciados hasta el momento, sólo se conserva en éste género de virus de plantas.

Todos estos resultados indican fuertemente que la MP de los ophiovirus es un miembro aislado de la superfamilia 30K, y sólo distantemente relacionado con la MP de los tenuivirus.

3. Análisis funcional del ácido aspártico conservado dentro de la superfamilia 30K

Como se mencionó previamente, una de las principales características de las MPs 30K es la conservación del motivo D. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue sustituir el ácido aspártico D141 de CPsV y D174 de MiLBVV por alanina, y analizar el efecto de la mutación en las diferentes funciones de movimiento viral, esto es, su capacidad para acumularse en PD, promover el incremento en el SEL de los Pds, y de dirigir el movimiento viral célula a célula.

3.1. Efecto de la mutación D141A de la MP^{CPsV} y D174A de la MP^{MiLBVV} en la localización en PDs

Para estudiar el efecto de la mutación del ácido aspártico en la localización en PD, se construyeron los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A por PCR superpuesta con oligonucleótidos que contienen el cambio de secuencia para la traducción del aminoácido indicado (ver Materiales y Métodos). En la construcción se fusionó eGFP traducionalmente, en su extremo C-terminal a (MP^{CPsV}D141A:eGFP y MP^{MiLBVV}D174A:eGFP). La expresión, el tamaño y la integridad de las proteínas de fusión se confirmaron por *western blot* (Figura 18). La diferencia de tamaño observada entre las bandas correspondientes a MP^{MiLBVV} y MP^{MiLBVV}D174A podrían deberse a cambios en el patrón de modificaciones postraduccionales generados por la mutación.



Figura 18. Análisis por *western-blot* de extractos proteicos de hojas agroinfiltradas a 3 dpai revelado con anticuerpo monoclonal anti-GFP. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda. Como control de carga se usó tinción con coomassie blue. n/i=extracto proteico de hojas no agroinfiltradas (control negativo).

Estos mutantes se coexpresaron individualmente con el marcador de plasmodesmos PDCB1:mCherry en hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración. Luego de 3dpi se visualizó su localización subcelular por microscopía confocal (CLSM), encontrándose resultados diferentes para ambas MPs. Mientras que el mutante MP^{CPsV}D141A:eGFP se observó co-localizando con

el marcador de PD al igual que la proteína salvaje $MP^{CPsV}:eGFP$ (Figura 19 A y B), es decir, esta mutación no afectó su localización en el PD, el mutante $MP^{MiLBVV}D174A:eGFP$ no se localizó en PDs, sino que sólo se observó en el citoplasma (Figura 19 C y D), lo que indicó que la sustitución D174A en la MP de MiLBVV suprime la localización en PDs.

Estos resultados indican que el ácido aspártico del motivo D desempeña un papel diferente en la capacidad de estas dos MPs para localizarse en PDs.

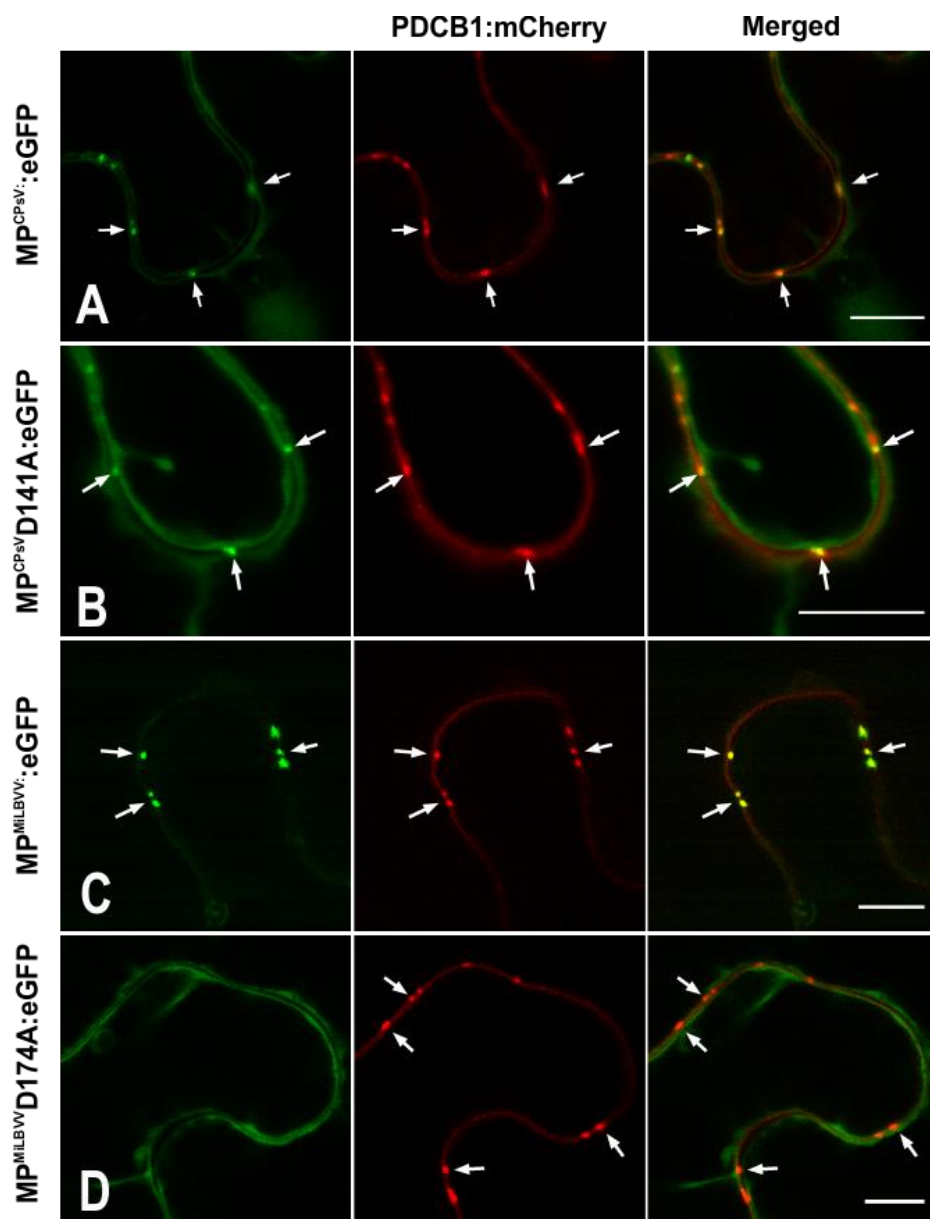


Figura 19. Localización subcelular de los mutantes $MP^{CPsV}D141A$ y $MP^{MiLBVV}D174A$. Imágenes de microscopía confocal de células epidérmicas de *N. benthamiana* co-expresando el marcador de PDs PDCB1:mCherry con: A) $MP^{CPsV}:eGFP$, B) $MP^{CPsV}D141A:eGFP$, C) $MP^{MiLBVV}:eGFP$, D) $MP^{MiLBVVD174A}:eGFP$. Escala=10 μ m. Las flechas señalan los PDs.

3.2. Efecto de la mutación D141A y D174A en la capacidad de las MPs de incrementar el SEL de los PDs

Se estudió el efecto de la mutación D141A en la MP de CPsV y D174A en la MP de MiLBVV tanto en su capacidad para incrementar el SEL, que se evidencia mediante la difusión intercelular de GFP (*gating* de GFP), o la capacidad de auto transportarse a las células vecinas (capacidad NCAP).

3.2.1. Análisis de la capacidad de los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A para facilitar la difusión intercelular de GFP

El estudio de la difusión intercelular a través de los PD se basa en el uso de GFP (*gating* de GFP) como reportero, ya que al ser una macromolécula monomérica hidrofílica con un radio de Stokes de 2,82 nm que se comporta idealmente, no interacciona de forma detectable con los componentes celulares y, por lo tanto, su difusión intracelular no está limitada (Swaminathan et al., 1997).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que en las hojas de tabaco que poseen tejido sumidero de fotoasimilados, la GFP (27 kDa) y otras moléculas de hasta 50 kDa pueden difundirse libremente a través de los PDs (Oparka et al., 1999), pero esto no ocurre en hojas fuente (hojas maduras), sino que la translocación depende de la presencia de otras proteínas que aumenten el SEL. Por estudios previos se sabe que las MP de CPsV y MiLBVV son capaces de aumentar el SEL de los PDs en hojas maduras, permitiendo a la proteína GFP difundir célula a célula (Robles Luna et al., 2013). Para determinar el efecto de las mutaciones en esta propiedad se realizaron ensayos de *gating* co-expresando GFP y las versiones mutadas de las MPs fusionadas traduccionalmente a mRFP (MP^{CPsV}D141A:mRFP y MP^{MiLBVV}D174A:mRFP) en hojas maduras de *N. benthamiana*. La expresión de las proteínas de fusión a mRFP se confirmó mediante western blot (Figura 20).



Figura 20. Análisis por *western-blot* de extractos proteicos de hojas agroinfiltradas a 3 dpi revelado con anticuerpo monoclonal anti-RFP. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda. Como control de carga se usó tinción con coomassie blue. n/i=extracto proteico de hojas no agroinfiltradas (control negativo).

Para lograr la expresión de GFP en células aisladas se usaron cultivos altamente diluidos de *A. tumefaciens*, mientras que para asegurar que todas las células del área infiltrada expresaran MP^{CPsV}D141A:mRFP, MP^{MiLBVV}D174A:mRFP o mRFP libre (control negativo), los cultivos de *A. tumefaciens* correspondientes se usaron en altas concentraciones. En la tabla de la Figura 21 se muestran que se encontraron grupos de 2 a 6 células fluorescentes en el 100% de los focos de expresión de GFP analizados en las hojas que coexpresaban MP^{CPsV}:mRFP, y en el 67% en las hojas coexpresando MP^{MiLBVV}:mRFP. Cuando se analizaron las MP mutantes, la fluorescencia de GFP permaneció casi exclusivamente dentro de la célula transformada, como se evidencia en sólo 14% de focos de expresión de GFP con sólo 2-3 células en el caso de hojas expresando MP^{CPsV}D141A:mRFP, y 11% en las hojas que expresaban MP^{MiLBVV}D174A:mRFP. Estos resultados son similares a los obtenidos para el control negativo, indicando que ninguno de los mutantes fue capaz de facilitar el paso intercelular de GFP (Figura 21). Esto demuestra que la conservación del ácido aspártico es necesario para que las MPs 30K de los ophiovirus puedan incrementar el SEL de los PDs, función que caracteriza a una MP viral.

A

	1 cell	2 cells	3 cells	4 cells	5 cells	6 cells	≥ 7 cells	movement
GFP + mRFP	84	12	4	0	0	0	0	16
GFP + MP ^{CPsV} :mRFP	0	14	29	0	29	14	14	100
GFP + MP ^{CPsV} D141A:mRFP	86	13	2	0	0	0	0	14
GFP + MP ^{MiLBVV} :mRFP	33	8	17	8	8	8	17	67
GFP + MP ^{MiLBVV} D174A:mRFP	89	11	1	0	0	0	0	11

B

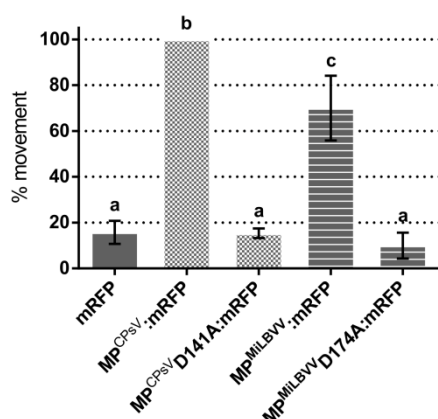


Figura 21. Ensayos de *gating* de GFP de los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A en hojas de *N. benthamiana*. A) Tabla indicando el porcentaje de focos de fluorescencia de GFP a 3dpai para cada condición descrita en la columna de la izquierda. La fila superior indica el número de células presente en cada foco. Movement= porcentaje de focos con 2 células adyacentes o más expresando GFP. B) Gráfico representando el porcentaje de focos de fluorescencia de GFP con más de 1 célula indicando la capacidad de los mutantes de facilitar la difusión intercelular de GFP citosólica, como % de movimiento. Las barras de error representan la media \pm SD de 4 experimentos independientes. Las medias indicadas con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey's HSD, $p < 0.001$).

3.2.2. Análisis de la capacidad de los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A para facilitar su propio tráfico intercelular

Las proteínas que tienen la capacidad de auto transportarse simplásticamente entre las células de la planta se denominan NCAPs (del inglés *non-cell autonomous proteins*) (Lee et al., 2003). Otra característica de las MP de los ophiovirus es la capacidad de mediar su propio transporte

intercelular a través de los PDs (Robles Luna et al., 2013), o sea, su función como NCAP. Con el fin de analizar si los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A conservan esa capacidad NCAPs, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos altamente diluidos de *A. tumefaciens* que permitan la expresión de MP^{CPsV}D141A:eGFP o MP^{MiLBVV}D174A:eGFP en células epiteliales aisladas. De esta forma, si los mutantes de las MP perdieran su capacidad NCAP, la fluorescencia de GFP permanecería dentro de las células transformadas, sin difundir a las células vecinas. Cuando se analizó la fluorescencia tanto de MP^{CPsV}D141A:eGFP como de MP^{MiLBVV}D174A:eGFP, se observaron principalmente células fluorescentes aisladas, con sólo un 16% de focos con 2 o más células en ambos casos, a diferencia del casi 90% obtenido con las proteínas salvajes (Figura 22). Estos resultados confirman que la sustitución del ácido aspártico por alanina impide que las MP modifiquen el SEL de los PD y faciliten su propio movimiento a las células adyacentes.

A

	1 cell	2 cells	3 cells	4 cells	5 cells	6 cells	≥ 7 cells	movement
GFP	88	10	2	0	0	0	0	12
MP ^{CPsV} :eGFP	11	9	5	13	4	18	41	89
MP ^{CPsV} D141A:eGFP	84	16	0	0	0	0	0	16
MP ^{MiLBVV} :eGFP	10	4	10	8	0	4	64	90
MP ^{MiLBVV} D174A:eGFP	84	11	3	1	0	0	0	16

B

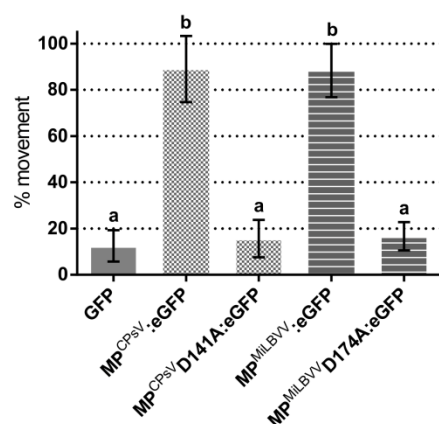


Figura 22. Ensayos de actividad NCAP de los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A en hojas de *N. benthamiana*. A) Tabla indicando el porcentaje de focos de fluorescencia de GFP a 3dpi para cada condición descrita en la columna de la izquierda. La fila superior indica el número de células presente en cada foco. Movement= porcentaje de focos con 2 células adyacentes o más expresando GFP. B) Gráfico representando el porcentaje de focos de fluorescencia de GFP con más de 1 célula indicando la capacidad de los mutantes de facilitar su propio transporte a través de los PDs. Las barras de error representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey's HSD, $p < 0.001$).

3.3. Efecto de la mutación D141 y D174 en la capacidad de la MP de CPsV y MiLBVV de complementar el movimiento intercelular del vector viral TMVΔMPΔCP:GFP

Para determinar el impacto en el movimiento viral célula a célula de la mutación D141A y D174A en las MPs de los ophiovirus, se realizaron ensayos de transcomplementación del movimiento del virus TMVΔMPΔCP:GFP (ver punto 1) con las proteínas mutantes MP^{CPsV}D141A:mRFP y MP^{MiLBVV}D174A:mRFP. Para esto, se coexpresó TMVΔMPΔCP:GFP junto con las MPs mutantes MP^{CPsV}D141A:mRFP o MP^{MiLBVV}D174A:mRFP en una mitad de hojas de *N. benthamiana*, o junto con mRFP libre (como control negativo) o la correspondiente MP sin mutar (como control positivo) en la otra mitad de las hojas. En la Figura 23 A y B (iii) (v),

se muestra que luego de 7 dpai, en ambos mutantes los focos corresponden a células aisladas con fluorescencia de GFP, similar a los resultados obtenidos con la proteína mRFP libre, mientras que las MPs sin mutar mostraron focos de varias células (Figura 23 A y B (ii) (iv)). Por lo tanto, estos resultados indican que ninguno de estos mutantes es capaz de complementar a TMVΔMPΔCP:GFP, demostrando que la presencia del ácido aspártico en las MPs 30K es esencial para la complementación del movimiento viral célula a célula.

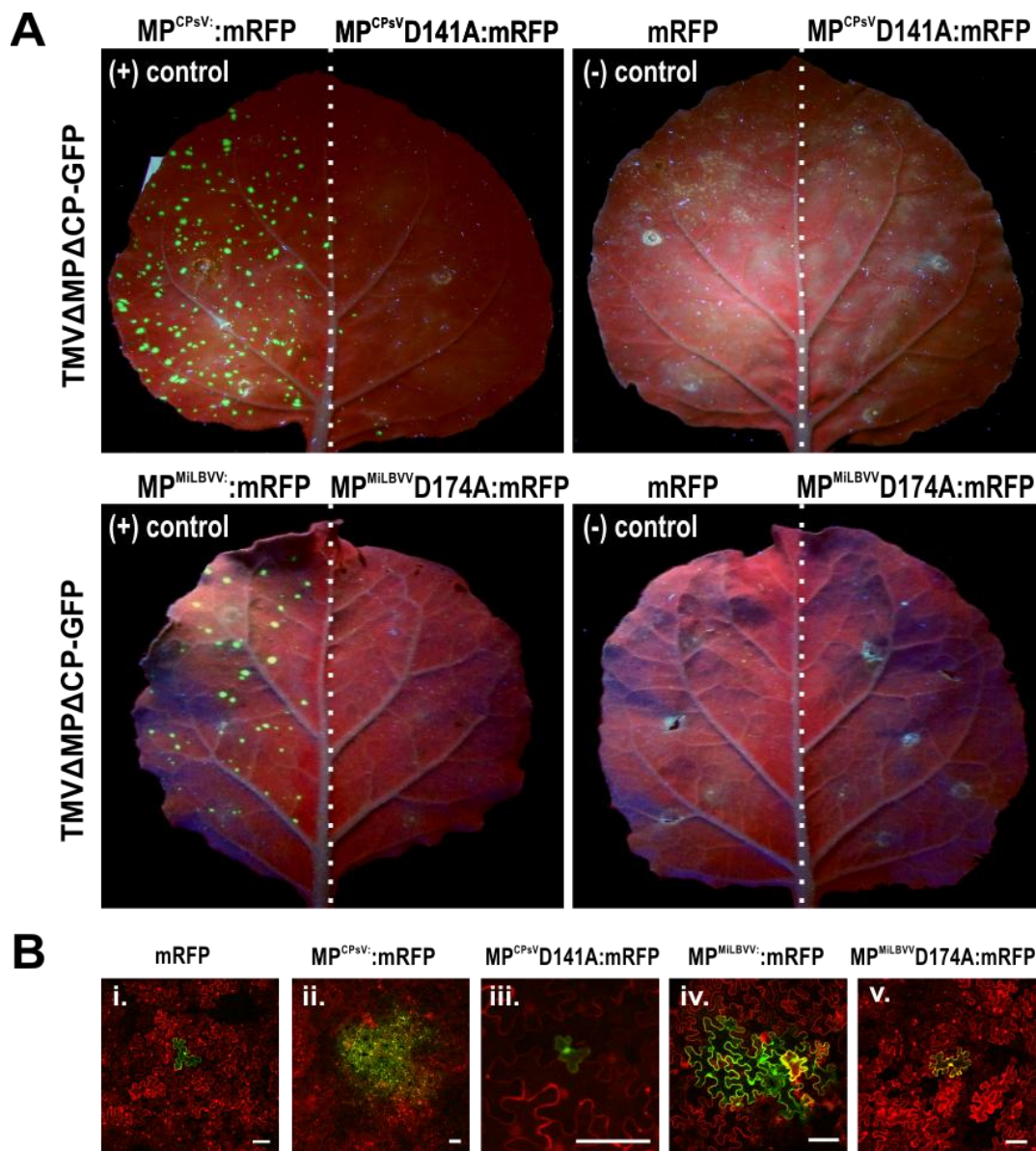


Figura 23. Ensayos de transcomplementación del movimiento de TMVΔMPΔCP:GFP con los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MILBVV}D174A en hojas de *N. benthamiana*. A) Imágenes representativas de hojas iluminadas con luz UV coexpresando TMVΔMPΔCP:GFP y las proteínas indicadas arriba, tomadas a 7 dpai. B) Imágenes representativas del tamaño de los focos de infección de TMVΔMPΔCP:GFP de hojas expresando (i) mRFP, (ii) MP^{CPsV}::mRFP, (iii) MP^{CPsV}D141A:mRFP, (iv) MP^{MILBVV}::mRFP, o (v) MP^{MILBVV}D174A:mRFP. Las imágenes se tomaron a 5 dpai. Escala=100μm.

CONCLUSIONES

- La MP de los ophiovirus constituye un miembro aislado dentro de la superfamilia 30K
- El 'motivo D' conservado en las MPs de los ophiovirus CPsV y MiLBVV es requerido para aumentar el tamaño límite de exclusión molecular (SEL) de los plasmodesmos.
- El 'motivo D' es esencial para la función movimiento viral célula a células de las MPs de los ophiovirus CPsV y MiLBVV.
- El 'motivo D' no es necesario para la localización de las MP de CPsV en plasmodesmos
- El 'motivo D' es necesario para la localización de las MP de MiLBVV en plasmodesmos

DISCUSIÓN

Las MPs virales son críticas para el establecimiento de infecciones virales exitosas, pero se sabe relativamente poco sobre sus características estructurales y funcionales, y su interacción con factores del hospedante. En general, las MPs de diferentes grupos de virus de plantas o incluso de géneros estrechamente relacionados, suelen mostrar baja similitud de secuencia, y especies virales estrechamente vinculadas pueden emplear diferentes estrategias para lograr la infección de sus hospedantes (Hull, 2014b), y aún mas, un virus puede poseer diferentes estrategias de movimiento frente a diferentes hospedantes (Heinlein et al., 1998).

Para comprender mejor el mecanismo de movimiento célula a célula de los ophiovirus, se realizó un análisis exhaustivo de la secuencia y la predicción de estructura secundaria, junto con estudios funcionales sobre las MPs de esta familia de virus segmentados negativos. Así, hemos encontrado que la MP de los ophiovirus es un miembro aislado de la superfamilia 30K, con una organización estructural única. Esto aporta no sólo a la comprensión de la biología de los ophiovirus, sino que además contribuye a la caracterización de esta superfamilia de proteínas virales. Esta superfamilia incluye virus pertenecientes a más de 15 géneros, con numerosos virus a RNA y a DNA como los geminivirus (Melcher, 1990; Mushegian and Elena, 2015; Mushegian and Koonin, 1993). Las diferentes especies de esta superfamilia, a pesar de las relaciones filogenéticas de sus MPs, usan diferentes mecanismos para el movimiento viral célula a célula (Carrington et al., 1996; Melcher, 2000). Hasta el momento, los intentos de predecir la estructura tridimensional de los miembros de la superfamilia 30K no han sido concluyentes, y su estructura cristalina sigue sin conocerse. En este contexto, los alineamientos múltiples de secuencias son una valiosa herramienta para estudiar las relaciones entre estructura y función proteica, delimitando los sitios de potencial importancia funcional e identificando aminoácidos conservados (Mushegian and Elena, 2015). Un análisis previo de similitud de secuencia y estructura de las MPs de los miembros de la superfamilia 30K, demostró la presencia de una región central conservada entre todas las MPs, consistente en siete láminas- β (Melcher, 2000; Mushegian and Elena, 2015). Los aminoácidos presentes en esta región se conservan en varias especies de la superfamilia, y se ha predicho que inducen pliegues y giros en la estructura de las MPs (Melcher, 2000; Mushegian and Elena, 2015).

En nuestro estudio encontramos que los mutantes del motivo D presente en las MP de CPsV y MiLBVV no son capaces de cumplir con sus funciones como MP viral. Este motivo está localizado en la región central conservada de las MP, de siete láminas- β , entre los aminoácidos 90 y 233 de la MP^{CPsV}, y además este residuo de ácido aspártico funcionalmente imprescindible, se conserva entre las 4 especies del género, cuyas secuencias se conocen.

El efecto de la sustitución del ácido aspártico conservado en las MPs 30K ha sido estudiado en MPs de los géneros *Tospovirus*, *Comovirus*, *Emaravirus*, *Tobamovirus* y *Cytorhabdovirus*. Se ha demostrado que el residuo D154 de la MP (NSm) del tospovirus TSWV, no parece estar involucrado en su localización en PDs, ya que cuando es sustituido por alanina, su distribución subcelular se conserva (Li et al., 2009). Por el contrario, la sustitución D143A en la MP de CPMV reduce su eficacia para dirigirse a la membrana plasmática de la célula (Bertens et al., 2000). La sustitución de alanina del D127 en la MP de Raspberry leaf blotch virus (RLBV) elimina su localización en PD, aunque la proteína permanece asociada a membranas (Yu et al., 2013). En el tobamovirus Turnip vein-clearing virus (TVCV), la sustitución de alanina del aspártico D103 de su MP (P30) causa la pérdida de localización en PD (Mann et al., 2016). Dentro del género *Cytorhabdovirus*, la sustitución del aspártico por alanina afecta el direccionamiento a PD de la MP (P3) de Lettuce necrotic yellows virus (LNYV), mientras que la localización de la P3 de Alfalfa dwarf virus (ADV) no resultó afectada por esta sustitución (Mann et al., 2016). Por lo tanto, este ácido aspártico parece no jugar un papel consistente en la localización subcelular de las MP, lo que podría explicar los dos resultados observados en los mutantes de los dos ophiovirus analizados. Se ha observado además, que la MP de CPsV es capaz de formar túbulos en los PD, por lo que es muy probable que este virus utilice una estrategia guiada por túbulos para el movimiento intercelular (Robles Luna, comunicación personal). Por el contrario, dichos túbulos no han sido detectados en expresiones transitorias de la MP de MiLBVV, lo que podría indicar la utilización de un mecanismo alternativo de movimiento.

Cuando se analiza la capacidad de los mutantes MP^{CPsV}D141A y MP^{MiLBVV}D174A de incrementar el SEL de los PDs, se obtienen resultados contundentes, el ácido aspártico es necesario para modificar el SEL de los PDs. Al analizar el caso de la MP^{CPsV}, vemos que su localización subcelular en los PDs no implica necesariamente que el PD vaya a experimentar la dilatación del poro, ya que el mutante MP^{CPsV}D141A se acumula en PD pero no es capaz de dilatarlo. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Heinlein (2015), quien menciona que la acumulación de MP en los PDs y el *gating* de PDs pueden representar funciones independientes de estas proteínas. Por otro lado, se ha demostrado que TMV es capaz de propagarse a través de los PD sin que la MP^{TMV} se encuentre atrapada en los PDs (Kim et al., 2005a). Por ejemplo, ciertos mutantes de MP^{TMV} expresados transitoriamente son capaces de moverse entre células adyacentes sin observarse acumulación en el canal del PD (Vogler et al., 2008). Es por esto, que el ensayo de NCAP de MP^{MiLBVV}D174A, aún cuando no se acumulara en PDs, era un interrogante, pero en el caso de este ophiovirus, ambas funciones se ven vinculadas al motivo D.

Cuando se analizan los ensayos de transcomplementación del movimiento del vector viral TMVΔMPΔCP:GFP, encontramos una dependencia entre la presencia del aspártico D141 en el caso de la MP de CPsV, o D174 en el caso de MiLBVV y la funcionalidad de las MPs de los ophiovirus. Resultados similares se han encontrado para los virus RLBV (*Emaravirus*) (Yu et al., 2013), *Rice stripe virus* (RSV, *Tenuivirus*) (Zhang et al., 2012), TSWV (*Tobravirus*) (Li et al., 2009), TVCV, ADV y LNYV (Mann et al., 2016), apoyando la importancia del motivo D para la función de movimiento viral de las MPs 30K. Estos resultados, junto con las diferencias observadas en la localización subcelular, demuestran que la localización en PD no indica necesariamente que la proteína es capaz de soportar el movimiento célula a célula del virus. Además, aunque el ácido aspártico parece estar implicado en el movimiento célula a célula de las MPs 30K, no parece ejercer el mismo papel en la localización en PD en todas las MPs 30K, incluso entre virus pertenecientes al mismo género, como suceden con los cytorhabdovirus y los ophiovirus.

A pesar de existir una gran diversidad funcional entre los miembros de la superfamilia 30K, el análisis de los alineamientos sus secuencias, reveló la presencia de una región o núcleo central que incluye aminoácidos potencialmente críticos para la estructura y funcionalidad de las MPs 30K. Además del motivo D, los residuos P123 y L124 (en la numeración para CPsV, ver Figura 17) también se conservan entre miembros distantes en la superfamilia 30K (Mushegian and Elena, 2015). Por ejemplo, el residuo 123 (P, prolina) también se encuentra en tomato torrado virus (ToTV, *Torradovirus*), Actinidia virus B (*Vitivirus*), Carrot mottle virus (CMotV, *Umbravirus*), Cycas necrotic stunt virus (*Nepovirus*), Alfalfa mosaic virus (AMV, *Alfamovirus*), TSWV (*Tospovirus*), Ourmia melon virus (OuMV, *Ourmiavirus*), Rose rosette virus (*Emaravirus*), LNYV (*Cytorhabdovirus*), Tomato bushy stunt virus (TBSV, *Tombusvirus*) entre otros (Mushegian and Elena, 2015). El residuo 124 (L, leucina) se conserva en TBSV, LNYV, Citrus leaf blotch virus (*Citrivirus*), Apple chlorotic leaf spot virus (*Trichovirus*), Parsnip yellow fleck virus (*Sequivirus*) y Piper yellow mottle virus (*Badnavirus*). Debido a la alta conservación de estos dos residuos, ubicados dentro del dominio central de las MP 30K, es probable que ambos se encuentren implicados en el movimiento viral tanto local como sistémico. Si bien se piensa que el residuo 124 no estaría implicado en el direccionamiento a la membrana plasmática, podría estar implicado en el anclado al PD, en el auto-ensamblado de los túbulos o en la interacción con factores celulares que faciliten la formación de túbulos (Margaria et al., 2016).

PERSPECTIVAS

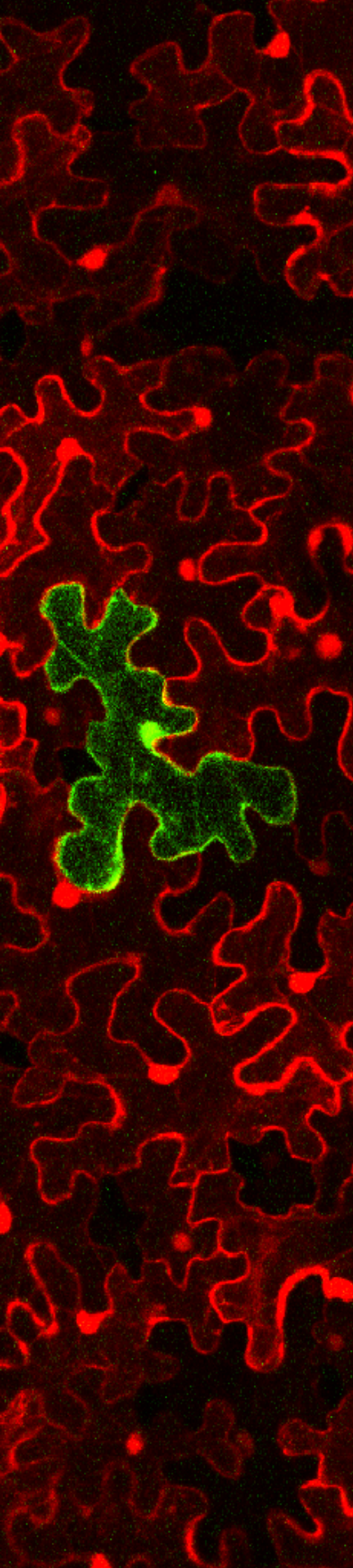
Para avanzar en la caracterización estructural de las MPs 30K sería interesante investigar el rol de ‘motivo D’ en las funciones de movimiento célula a célula y larga distancia (ver Capítulo 4) de otras especies de ophiovirus y de especies filogenéticamente relacionadas con los ophiovirus en estudio, como por ejemplo, la proteína PC4 del tenuivirus IWSV. En particular, determinar la importancia del residuo de ácido aspártico altamente conservado en la localización en PDs de las demás especies del género, nos permitiría ampliar el conocimiento actual de las relaciones evolutivas de sus integrantes, ya que como se describió, parece no cumplir un rol general en las distintas especies.

Por otro lado, generar una versión de la MP de los ophiovirus donde sólo se exprese el dominio central (*core domain*) fusionado a proteínas reporteras, resultaría de particular interés para delimitar las funciones de movimiento asociadas a tal dominio.

La conservación de aminoácidos en especies virales pertenecientes a diferentes taxones, que muestran una organización genómica y estructural diferente, sugiere su relevancia en la funcionalidad de estas MPs. Dado que el aminoácido 124 se conserva en varias MPs 30K (Mushegian and Elena, 2015), y se ha visto implicado en la capacidad de la MP de OuMV de formar túbulos en los PDs, sería de sumo interés comprobar si la mutación de este residuo en los ophiovirus y otros miembros de la superfamilia 30K está relacionada con la capacidad de localizarse en PDs, y en particular de formar túbulos.

Por último, caracterizar el interactoma de diferentes mutantes en el dominio central de las MP de CPsV y MiLBVV, nos brindaría información fundamental para comprender los mecanismos de acción de estas MPs. En particular, cuando se compare con el interactoma de las respectivas MP salvajes, podremos aproximarnos a descubrir los mecanismos celulares y moleculares que están implicados en la funcionalidad de estas proteínas.

Sin lugar a dudas, el descubrimiento de nuevos grupos de virus de plantas y el estudio adicional de las secuencias de los grupos ya descritos, brindará una mayor cobertura de secuencias, permitiendo construir mejores modelos probabilísticos y dar una explicación más concluyente de las relaciones entre las secuencias de las MPs de la superfamilia 30K.



CAPÍTULO 2

Predicción de dominios proteicos
y análisis funcional de la MP de
CPsV

INTRODUCCIÓN

1. Bioinformática de proteínas aplicada a la virología

La bioinformática se define generalmente como el uso de técnicas matemáticas e informáticas para resolver problemas biológicos mediante la creación o el uso de programas informáticos, modelos matemáticos o ambos (Chou, 2004). Basándonos en esta definición, se han utilizado enfoques bioinformáticos para la clasificación de virus y la predicción de diferentes aspectos de sus proteínas.

Las propiedades infectivas de un virus están determinadas por el conjunto de sus proteínas virales. Aunque los virus son organismos acelulares, es necesario que las proteínas virales residan en los compartimentos celulares específicos de la célula hospedante para cumplir sus funciones. Para lograr esto, los virus han desarrollado diversas estrategias para interactuar con factores celulares preexistentes. De esta forma, la clase estructural y la localización subcelular son dos de las características más importantes de las proteínas, vinculadas directamente con sus funciones biológicas. Como sabemos, una célula está constituida por diferentes componentes, compartimentos y orgánulos que están especializados en realizar determinadas tareas (Chou and Shen, 2007). El direccionamiento de prácticamente todas las proteínas a sus ubicaciones correctas tanto dentro como fuera de la célula, requiere de secuencias de localización específicas para cada destino. En particular, las proteínas sintetizadas en el citosol, requieren secuencias de direccionamiento específicas para alcanzar las distintas organelas. Por ejemplo, la importación de proteínas a través de los poros nucleares está mediada por señales de localización nuclear (NLS) presentes en las proteínas transportadas (Freitas and Cunha, 2009; Nigg, 1997; Nigg et al., 1991). En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios para desarrollar métodos de predicción de la localización subcelular de proteínas, tanto eucariotas como procariotas (Cedano et al., 1997; Chou, 2001; Chou and Elrod, 1999; Nakai, 2000; Nakai and Horton, 1999; Nakashima and Nishikawa, 1994). Muchos de los servidores actualmente disponibles, fueron desarrollados para predecir la ubicación subcelular de diferentes proteínas (Jin et al., 2008; Li and Li, 2008; Lin et al., 2008; Shi and Xu, 2011; Wang et al., 2011a; Zheng et al., 2011), sin embargo, pocos están especialmente desarrollados para tratar con proteínas virales (Shen and Chou, 2007).

2. Localización subcelular y dominios funcionales de la MP 30K de TMV

Como se mencionó en la introducción general, la primera MP en ser identificada fue la proteína 30K de TMV, que sabemos que se une a ssRNA o ssDNA de manera no específica (Citovsky et

al., 1990). Cada vez aparecen más evidencias que apoyan la idea de que la MP de TMV forma complejos con el genoma viral que se mueven a través de las células usando la red del citoesqueleto, se asocian con las pectin metil esterasas de la pared celular y aumentan la permeabilidad de los plasmodesmos (Chen et al., 2000; Otulak and Garbaczewska, 2011; Tzfira et al., 2000; Waigmann et al., 2004b). La región central de la MP de TMV está rodeada por dos dominios de unión de ácidos nucleicos monocatenarios (Citovsky et al., 1992) y un dominio involucrado tanto en el direccionamiento a PD como en el aumento del SEL (Boyko et al., 2000; Waigmann et al., 1994). Se ha propuesto que la región C-terminal regula el acceso a estos dominios funcionales, y se demostró que esta región alberga tres sitios de fosforilación, que desempeñan un papel determinado en la regulación de la actividad biológica de la MP (Citovsky et al., 1993; Waigmann et al., 2000). Esto resalta la importancia de la fosforilación en el mecanismo regulador que controla la interacción entre la MP y los PDs (Waigmann et al., 2000). En etapas de infección tardías, la MP^{TMV} se asocia con los microtúbulos, esta capacidad se correlaciona directamente con su actividad en el movimiento viral (Boyko et al., 2000; Niehl et al., 2013; Pena and Heinlein, 2012).

Las mutaciones en la MP parecen ejercer efectos mediante interrupción de los dominios funcionales de la proteína. La estructura de estos dominios, en lugar de aminoácidos específicos dentro de los dominios, es importante para la función de la proteína (Kahn et al., 1998). Esta observación es consistente con el hecho de que las MPs 30K comparten relativamente poca similitud de secuencia, pero realizan las mismas funciones. Así, las funciones compartidas por las MPs 30K, probablemente surgen de la presencia de estructuras similares en sus secuencias, en las que los dominios homólogos realizan las mismas actividades.

A pesar de los extensos estudios llevados a cabo con la MP de TMV desde su descubrimiento, una de las características funcionales más importantes y fundamentales de esta proteína, su señal de localización en plasmodesmos (PLS), ha sido recientemente identificada (Yuan et al., 2016), siendo la única PLS encontrada en proteínas virales hasta el momento. Sólo se han reportado tres PLS, pero todas ellas en proteínas endógenas (Chen et al., 2013; Chen et al., 2014; Kim et al., 2005b; Kim et al., 2003). Esta secuencia funcional en la MP de TMV comprende los primeros 50 residuos amino-terminales y resulta ser necesaria y suficiente para dirigir a CFP (*cyan fluorescent protein*), a los PDs, sin embargo, no es necesaria para las etapas posteriores, es decir, para la entrada y el movimiento a través de los PDs (Yuan et al., 2016).

3. Localización subcelular y funciones asociadas de la MP 30K de CPsV

La proteína de movimiento célula a célula de CPsV está codificada por el RNA 2 y además de sus funciones como MP viral, también está implicada en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional (Robles Luna et al., 2017b).

Los primeros intentos por determinar la localización subcelular de la M^{CPsV} se realizaron por ensayos de fraccionamiento subcelular de tejido foliar infectado con CPsV. Estos ensayos permitieron detectar a la M^{CPsV} en la fracción soluble del citoplasma, y en alguna de las fracciones enriquecidas en núcleo/cloroplasto, pared celular y fracción microsomal (Peña, 2009). Más adelante, se logró determinar la localización subcelular mediante análisis por CLSM de fusiones de la MP a proteínas fluorescentes expresadas de forma transitoria en células epiteliales de *N. benthamiana* (Figura 24). Así, se la encontró localizada dentro del canal de los PDs, en estructuras puntuales en la superficie de los cloroplastos y en asociación con los microtúbulos, estas localizaciones podrían estar vinculadas con su función de movimiento. En relación a su función como proteína supresora, se la ha encontrado en el núcleo celular, en citoplasma y en asociación con *P-bodies* (Robles Luna et al., 2013).

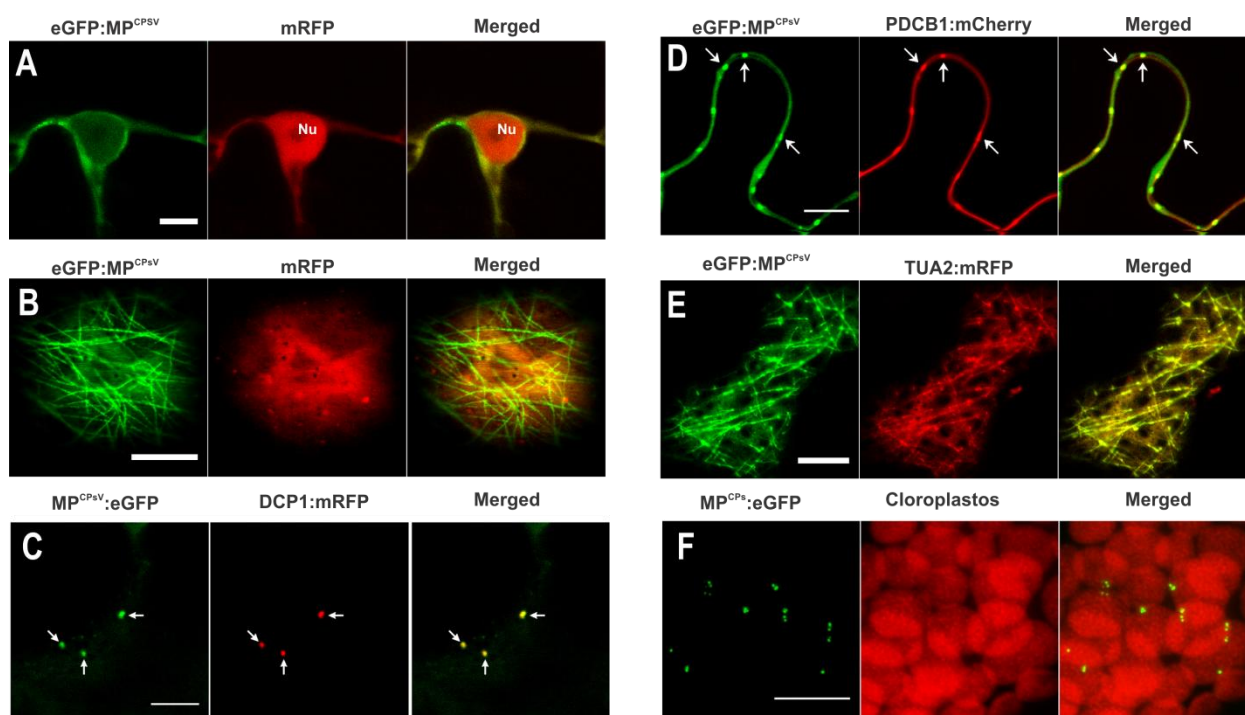


Figura 24. Localización subcelular de la proteína MP^{CPsV} . A-B) Co-localización de $eGFP:MP^{CPsV}$ con el marcador de núcleo y citoplasma mRFP. C) Co-localización de $MP^{CPsV}:eGFP$ con el marcador de *P-bodies* DCP1:mRFP, las flechas indican los *P-bodies* colocalizando con la $MP^{CPsV}:eGFP$. D) Co-localización de $eGFP:MP^{CPsV}$ con el marcador de PDs PDCB1:mCherry, las flechas indican los PDs donde ocurre co-localización con $eGFP:MP^{CPsV}$. E) Co-localización de $eGFP:MP^{CPsV}$ con el marcador de microtúbulos TUA2:mRFP. F) Localización de $MP^{CPsV}:eGFP$ en cloroplastos. Escala=10 μ m. Tomadas con modificaciones de Robles Luna, 2014.

Por ensayos de FLIM y coimmunoprecipitación, se encontró que la MP^{CPsV} es capaz de interactuar con la CP^{CPsV}. Dicha interacción se espera que esté vinculada con algunas de las funciones llevadas a cabo por la MP, como la formación de complejos de replicación, o con un rol activo de la CP en el proceso de movimiento del genoma viral. Además de interactuar con su CP, la MP^{CPsV} interactúa consigo misma en los PDs, lo que estaría directamente vinculado con su capacidad para formar túbulos en los PDs (Robles Luna, 2014). También se ha determinado que la MP^{CPsV} tiene la capacidad de unirse a RNA doble cadena *in vitro* (Robles Luna et al., 2017b), lo cual podría estar asociado con su función supresora.

HIPÓTESIS

- La MP de CPsV contiene dominios proteicos determinantes de su localización subcelular.
- La MP de CPsV contiene dominios funcionales asociados con sus distintas actividades.
- Los dominios funcionales de la MP de CPsV son independientes entre sí.
- Existe una asociación directa entre la localización subcelular de la MP de CPsV y sus funciones tanto en el movimiento viral como en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional.

OBJETIVOS

Estudiar la localización subcelular de las proteínas de los ophiovirus, en particular los dominios proteicos responsables de cada localización, es de suma importancia para comprender aún más la biología de los mismos. Por lo tanto, en este capítulo, nos centramos en el estudio de la localización subcelular de la MP de CPsV con motivo de determinar los posibles dominios proteicos que son funcionales para el proceso infectivo de este virus. Sabemos que esta proteína, además de ser imprescindible para el movimiento viral, se encuentra involucrada en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional. Así, podríamos establecer relaciones y diferencias entre las localizaciones subcelulares observadas y las funciones de movimiento y supresión.

Por lo tanto, en este capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Predecir las posibles localizaciones subcelulares de la MP de CPsV mediante el uso de servidores bioinformático diseñados para tal fin.
2. Generar una serie de mutantes en base a la predicción bioinformática obtenida, que alteren posibles dominios funcionales de la MP^{CPsV}.
3. Realizar un análisis funcional de estos dominios proteicos en cuanto a su importancia para:
 - 3.1. El direccionamiento a sus diferentes ubicaciones subcelulares
 - 3.2. Las distintas actividades como proteína de movimiento viral
 - 3.3. Su función como proteína supresora del silenciamiento génico
4. Establecer vínculos directos entre las localizaciones subcelulares y las funciones de la MP en el ciclo viral.

RESULTADOS

1. Estudio bioinformático de la MP de CPsV

El primer paso para la caracterización de los dominios funcionales de la MP^{CPsV} fue realizar un análisis bioinformático exhaustivo de la secuencia de la MP^{CPsV} utilizando servidores para la predicción de distintas características que se detallarán a continuación.

1.1. Predicción bioinformática de posibles señales de localización y exportación nuclear presentes en la secuencia de MP^{CPsV}

Como se mencionó en la introducción, la proteína MP^{CPsV} tiene localización nuclear en células epiteliales de *N. benthamiana*. La mayoría de las proteínas nucleares contienen una señal de localización nuclear (NLS) que dirige su translocación del citoplasma al núcleo. Sin embargo, es posible que una proteína sin una NLS funcional pueda entrar al núcleo a través del co-transporte con otra proteína que si presenta una NLS funcional. Las reglas y señales que rigen la localización y la exportación nuclear de proteínas están bien definidas. Las NLS pueden clasificarse en varias categorías. La mayoría de los motivos identificados hasta el momento, incluidos los motivos pat4 y pat7 y las NLSs bipartitas, se componen de aminoácidos básicos de una longitud de secuencia determinada (Cokol et al., 2000; Garcia-Bustos et al., 1991; Macara, 2001). El tipo clásico de NLS, consiste en unos pocos aminoácidos básicos. Dentro de esta categoría, se encuentran las NLS con motivo pat4, patrón de cuatro residuos continuos generalmente básicos, y las NLS con motivo pat7, de siete residuos, que comienzan con un residuo de prolina seguido por seis aminoácidos, de los cuales tres de los cuatro últimos son básicos. Cuando la NLS es bipartita (NLS_BP), contiene dos motivos de aminoácidos básicos separados entre sí por 10-12 aminoácidos. En contraste con las NLS clásicas, las señales de importación nuclear para varias proteínas virales consisten en dominios ricos en arginina, como en el caso de HIV-1 Rev (Hammerschmid et al., 1994), HTLV-1 Rex (Siomi et al., 1988) y HSV-1 VP13/14 (Donnelly and Elliott, 2001).

Para determinar la presencia de NLS putativas en la proteína MP^{CPsV} se realizó una predicción de tales secuencias utilizando los *softwares* ScanProsite (de Castro et al., 2006) y WoLF PSORT (Horton et al., 2007), encontrándose los siguientes resultados (ver Figura 25):

- ScanProsite: predicción de dos perfiles de NLS_BP, con un nivel bajo de confianza. NLS1_BP entre los aminoácidos 86 y 102 (KKLKLGLTKSITDKLRK) con un score = 3.0;

y NLS2_BP entre los aminoácidos 255 y 271 (KRDEYKKKMIENERIRR) con un score = 3.0.

- WoLFPSORT: predicción de las mismas dos NLS_BP mencionadas anteriormente más una NLS clásica entre los aminoácidos 84 y 87 (pat4, HKKK). Este programa utiliza las siguientes dos reglas para detectar NLSs clásicas: 1) patrón pat4 compuesto por cuatro aminoácidos básicos (K o R) o tres K/R más una H o P; 2) patrón pat7, que empieza por P y luego de tres aminoácidos cualesquiera, un segmento básico de tres residuos K/R.

Es importante destacar que la secuencia de la posible NLS2_BP también se conserva en la MP de los ophiovirus MiLBVV y LRNV, y que la MP de LRNV también contiene una NLS clásica (pat4, KPKK) entre los aminoácidos 153 y 156 (Figura 25).



Figura 25. Alineamiento múltiple de las secuencias de las MP de los ophiovirus BIMaV, CPsV, MiLBVV y LRNV. Se muestran las regiones de secuencia próximas a los motivos predichos. Se resaltan en rojo las regiones de secuencia NLS_BP predichas y en naranja los motivos pat4 presentes en MP^{CPsV} y MP^{LRNV}. Coloración en base al grado de identidad de los residuos alineados.

La MP^{CPsV} también se encuentra en citoplasma, y considerando que para que una proteína se mueva entre el núcleo y el citoplasma requiere la presencia de una o varias NLSs, como también de una señal de exportación nuclear (NES), sería probable que la MP^{CPsV} contenga alguna NES en su secuencia. Las NES consisten en secuencias hidrofóbicas, ricas en leucina (Nakielny and Dreyfuss, 1997), y hasta el momento se han identificado tres tipos de NES: 1) secuencias ricas en leucina de aproximadamente 10 aminoácidos, identificada inicialmente en el inhibidor de la proteína quinasa (PKI) y en el VIH-1 Rev, 2) la secuencia M9 de hnRNP A1, y 3) una secuencia de 24 aminoácidos encontrada en hnRNP K (Nakielny and Dreyfuss, 1997). Se ha encontrado un número creciente de proteínas virales que contienen una secuencia NES ricas en leucina, que les permite alternar su localización entre el núcleo y el citoplasma, incluyendo HIV-1 Rev (Kalland et al., 1994; Meyer and Malim, 1994; Meyer et al., 1996), HTLV-1 Rex (Bogerd et al., 1996), influenza virus NS1 (Li et al., 1998) y la proteína SM de *Epstein-Barr virus* (EBV) (Boyle et al., 1999; Chen et al., 2001).

Por lo tanto, se realizó una predicción de NES putativas en la proteína MP^{CPsV} utilizando el servidor NetNES (la Cour et al., 2004). Este servidor encuentra una región de secuencia con baja probabilidad de actuar como señal de exportación nuclear entre los aminoácidos 79 y 90. Esta región está parcialmente solapada con la posible NLS1_BP. Si bien se espera una señal de este tipo, el servidor NetNES no reconoce motivos NES en las MP de ninguno de los otros ophiovirus. En la Figura 26 se indica la posición de las señales NLS y NES putativas encontradas en la MP^{CPsV}.

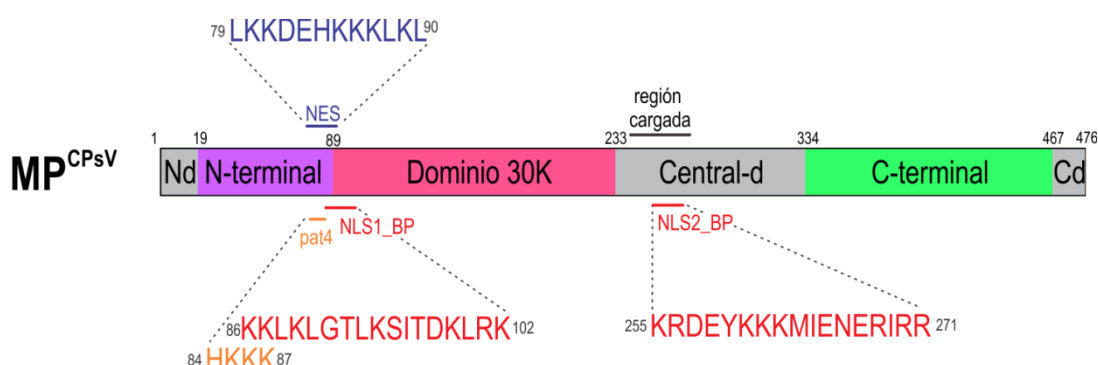


Figura 26. Esquema de la proteína MP^{CPsV} con las posiciones y las secuencias de dos NLS_BP, una NLS 'pat4' y una NES predichas. Se marcan el dominio 30K, la región cargada y los dominios. Nd, región N-terminal desordenada; N-terminal, dominio N-terminal; Central-d, región central desordenada; C-terminal, dominio C-terminal; Cd, región C-terminal desordenada.

1.2. Predicción bioinformática de posibles señal de direccionamiento a cloroplastos presente en el extremo amino terminal de la MP^{CPsV}

En base a la localización de la MP^{CPsV} en la superficie de los cloroplastos, se realizaron predicciones bioinformáticas de probables señales que la direccionen al cloroplasto. Los péptidos de tránsito a cloroplastos (cTP) son secuencias N-terminales que se escinden al entrar en su compartimento final, similares a los péptidos señal (SP) de la vía secretoria. Sus secuencias están poco caracterizadas y los motivos de secuencias reportados son aún menos conservados que los de los SP. Se ha descrito que estos péptidos de tránsito a cloroplastos tienden a ser ricos en residuos hidroxilados como la serina, y están desprovistos de residuos ácidos. Para predecir posibles cTPs, uno de los primeros *software* diseñados fue ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) basado en redes neuronales (NN). Un sucesor de ChloroP fue el *software* TargetP (Emanuelsson et al., 2000) también basado en NN. Ambos servidores predicen además el tamaño y sitio de clivaje del péptido.

Se analizó la secuencia de la MP^{CPsV} con el servidor TargetP, el cual predice (con un score=0.553) un péptido de 21 aminoácidos del extremo N-terminal que podría actuar como

señal de tránsito a cloroplastos. En la Figura 27 se indica la localización y secuencia del cTP predicho.

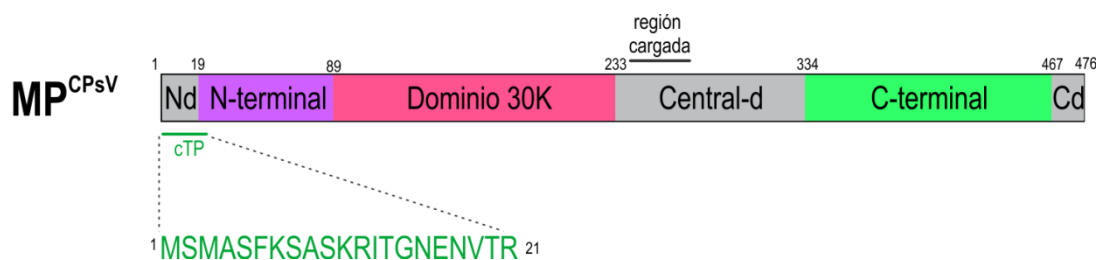


Figura 27. Esquema de la proteína MP^{CPsV} con la posición y la secuencias del cTP predicho

Cuando se analizan las secuencias de las MP de los demás miembros de la familia, se encuentran cTP putativos con score similar y longitudes variables en la MP^{LRNV} (score=0.482, longitud 31 aa), y MP^{MiLBVV} (score=0.536, longitud 61 aa). Sin embargo, no se predice ningún péptido similar en la MP^{BIMaV}. En la Figura 28 se muestra un alineamiento de la región N-terminal de las MP^{ophiovirus} donde se señala la secuencia y el sitio de clivaje de cada cTP.

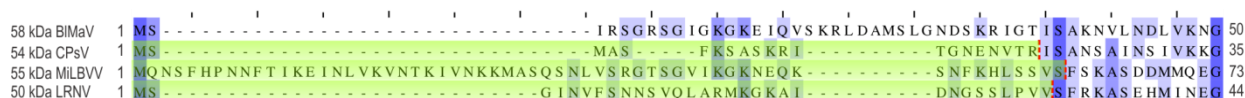


Figura 28. Alineamiento múltiple de la región N-terminal de las secuencias de las MP de los ophiovirus BIMaV, CPsV, MiLBVV y LRNV. En rojo se marca la secuencia y los probables sitios de clivado del cTP en la MP^{CPsV}, MP^{MiLBVV} y MP^{LRNV}. Coloración en base al grado de identidad de los residuos alineados.

1.3. Predicción de posibles regiones de unión a ácidos nucleicos

Como sabemos, una amplia gama de procesos biológicos que pueden ser llevados a cabo por proteínas virales, incluyendo la regulación de la expresión génica, el transporte de genomas virales y la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional, están mediados por interacción proteína-ácido nucleico. Se ha determinado por ensayos *in vitro*, que la proteína MP^{CPsV} presenta la capacidad de unir dsRNAs mientras que no une siRNAs (Robles Luna et al., 2017b). Por lo tanto, se hizo una predicción de regiones de unión a RNA utilizando los software FastRNABindR (El-Manzalawy et al., 2016), y Pprint (Kumar et al., 2008). Se encontraron varios residuos a lo largo de toda la secuencia con probabilidad de unión a ácidos nucleicos. Además se realizó el análisis con Pprint de las secuencias de la MP de BIMaV, MiLBVV y LRNV. En la Figura 29 se muestra un alineamiento de las secuencias de las cuatro MP realizado con el software PROMALS, donde se resaltaron en rojo los residuos predichos por Pprint para cada MP. En negrita se señalan las posiciones con probabilidad de unión a ácidos

nucleicos que se conservan en MP^{CPsV} y al menos en dos de las tres MP restantes. Se resaltaron en verde los residuos de unión predichos por FastRNABindR para la MP^{CPsV}.



Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias de MPBIMaV (58kDa), MPCP_{SV} (54kDa), MP_{MILBVV} (55kDa) y MP_{LRNV} (50kDa). Los residuos de unión a RNA predichos por Pprint se marcan en rojo, en negrita los residuos de unión conservados, y en verde los predichos por FastRNABindR para la MPCP_{SV}.

Para analizar la ubicación de estos residuos en la estructura tridimensional de MP^{CPsV}, se realizó una predicción de estructura tridimensional con los *softwares* I-TASSER (Yang et al., 2015) y MUSTER (Wu and Zhang, 2008). La calidad de los modelos propuestos se analizó con Verify_3D (Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992) y ProSA (Wiederstein and Sippl, 2007). Se encontró que el modelado de mejor calidad es uno de los predichos por I-TASSER, el cual posee un C-score=-2.97. Los *templates* destacados utilizados por I-TASSER para este modelado fueron: la estructura de un segmento de la RNA polimerasa de *Cypovirus* (virus a dsRNA de insectos) (PDB: 3JB6), una proteína transportadora de lípidos de *H. sapiens* (PDB: 2OBD) y una proteína de unión a DNA de *D. melanogaster* (PDB: 4XGC). En la Figura 30 se muestra la estructura tridimensional predicha, donde se resaltan en azul los residuos de unión a RNA que se conservan en al menos dos de las otras MP^{ophiovirus}.

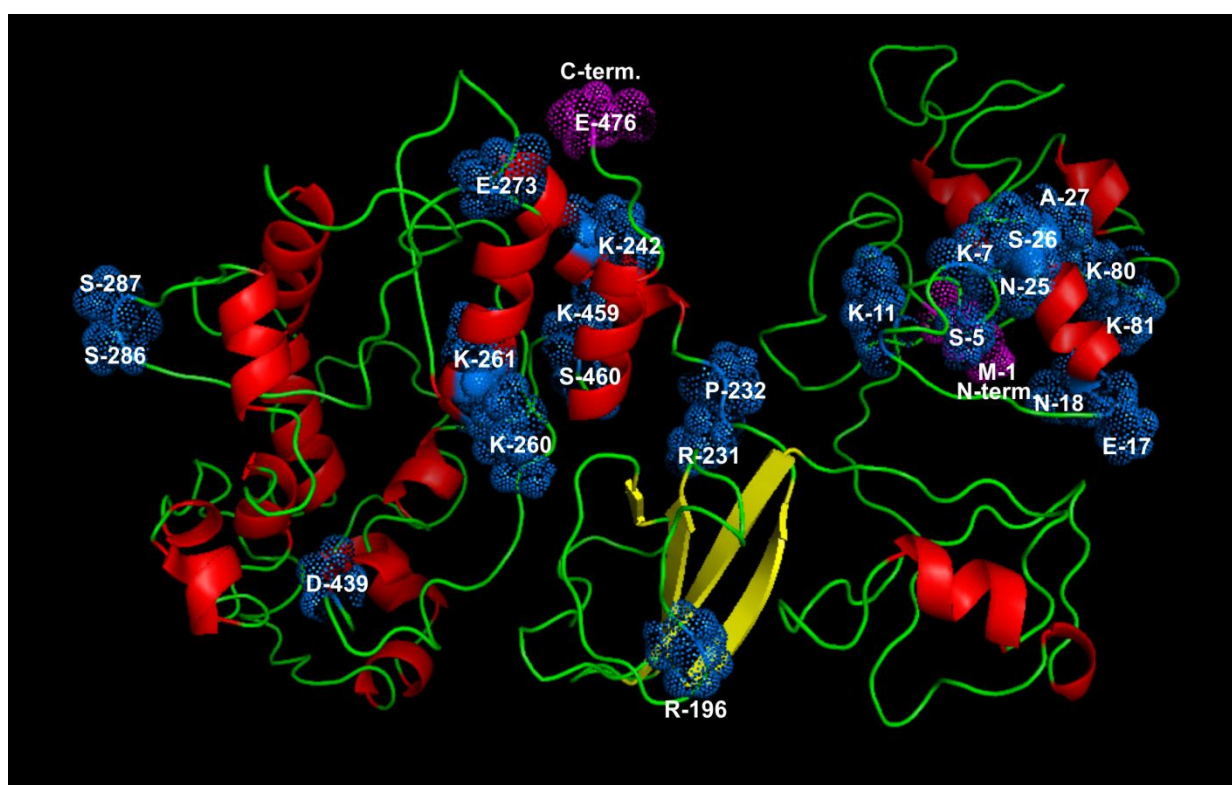


Figura 30. Estructura tridimensional de MP^{CPsV} predicha por el servidor I-TASSER. Se marcan en azul los residuos de unión a RNA conservados entre las MP^{ophiovirus}. En magenta se marcan los extremos N-terminal (M-1) y C-terminal (E-476) de la secuencia.

2. Diseño y generación de versiones mutadas de la MP de CPsV

Para confirmar la asociación entre la localización de una proteína y sus actividades, una estrategia muy útil es generar mutantes que nos permitan poner a prueba tales asociaciones, es decir, si la pérdida de la localización se corresponde o no con la pérdida de la función. Por lo

tanto, se generaron varios mutantes de la MP^{CPsV} donde se alteraron posibles regiones funcionales, en base a las predicciones bioinformáticas y otras propiedades ya encontradas previamente, como la localización en plasmodesmos.

Se diseñaron tres mutantes de MP^{CPsV} en los motivos de localización nuclear predichos:

- Mutante MP^{CPsV} Δ NLS1_BP: con una delección de la señal de localización nuclear bipartita cercana al extremo N-terminal de la secuencia (ver Figura 26)
- Mutante MP^{CPsV} Δ NLS2_BP: con una delección de la señal de localización nuclear bipartita localizada hacia el extremo C-terminal de la secuencia (ver Figura 26)
- Mutante MP^{CPsV} Δ NLS1.2_BP: con una delección en los residuos de ambas NLS_BP predichas (ver Figura 26)

Como se mencionó, la localización en PDs de la MP^{CPsV} es fundamental para su función. Por lo que es posible que la región amino terminal de la proteína, contenga motivos funcionales de direccionamiento a PDs (PLS, *plasmodesmal localization signal*). Sin embargo, no hay programas que permitan predecir tales motivos, debido principalmente a que son muy pocas las PLS descritas, lo que dificulta la identificación de patrones secuenciales conservados. Así mismo, la localización observada en cloroplastos también podría requerir de una señal de direccionamiento presente en esta región. Por lo tanto, para analizar la presencia de motivos de direccionamiento aminoterminales, se diseñó el siguiente mutante:

- Mutante MP^{CPsV} Δ N: donde se eliminaron los 50 aminoácidos del extremo N-terminal

Este mutante pierde además posibles sitios de unión a RNA.

Además, se diseñó un mutante de la región carboxilo terminal para analizar la presencia de modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, etc.) de los residuos presentes en esta región que puedan ser requeridos para la función de la MP^{CPsV}, como sucede con la MP 30K de TMV (Citovsky et al., 1993; Waigmann et al., 2000):

- Mutante MP^{CPsV} Δ C: se eliminaron los últimos 73 aminoácidos C-terminales

Para la generación de los mutantes mencionados se utilizó la estrategia de *overlapping* PCR detallada en la sección de materiales y métodos.

En la Figura 31 se muestra un esquema de los cinco mutantes generados.

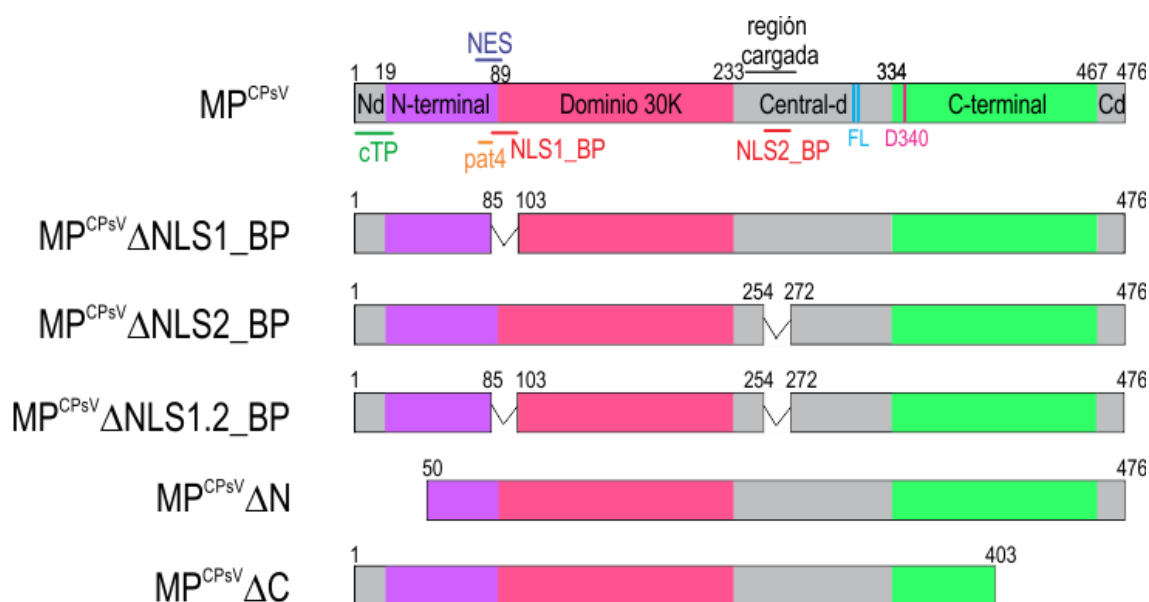


Figura 31. Esquemas de los mutantes de MP^{CPsV} generados. Se señala en celeste la secuencia del sitio putativo de clivaje (309FL310) y en magenta el sitio catalítico putativo del dominio proteasa (D340).

3. Estudio funcional de los mutantes de MP^{CPsV}

Para el análisis funcional de los mutantes de MP^{CPsV}, se generaron fusiones traduccionales de los mismos a las proteínas fluorescentes eGFP y mRFP (ver Materiales y Métodos). Una vez obtenidas las diferentes proteínas de fusión, se analizó su comportamiento en distintos ensayos de expresión transitoria en células epiteliales de *N. benthamiana*.

3.1. Análisis de la expresión de los mutantes de MP^{CPsV}

En estudios previos, (Peña, 2009) se había observado que un extracto proteico de tejido infectado con CPsV, además de la MP^{CPsV}, se observa dos bandas también reveladas con un antisuero específico. Posteriormente, Robles Luna (comunicación personal) analizando la expresión de la proteína MP^{CPsV} fusionada traduccionalmente en su extremo C-terminal a distintos *tags* (eGFP, mRFP y FLAG), y revelando con anticuerpo específico contra el *tag*, siempre se observaba la presencia de dos bandas reactivas, una del tamaño esperado para la proteína de fusión, y otra de menor tamaño, también fusionada al *tag*. Éstas y otras evidencias obtenidas recientemente en nuestro laboratorio por Robles Luna, indican que las bandas de menor tamaño son el resultado de un auto-clivaje *in vivo* de la MP^{CPsV}, y que este procesamiento sería funcional, generando péptidos involucrados en funciones independientes en el proceso infectivo (Robles Luna et al., 2017a).

En la Figura 32 se muestra el análisis de la expresión *in planta* de los mutantes, y como se señala, se detecta una banda del tamaño correspondiente a las MPs fusionadas a eGFP. Excepto por el mutante MP^{CPsV}ΔC:eGFP, todos los demás mutantes mostraron una segunda banda de menor tamaño, producto del procesamiento (auto-clivaje), correspondiente al fragmento C-terminal fusionado a eGFP. Por lo tanto, la fusión del marcador al extremo C-terminal no afectó el autoclivaje de estos mutantes. En el caso del mutante MP^{CPsV}ΔC:eGFP, podría estar afectado el dominio de la proteasa que realiza el clivaje, ya que el sitio catalítico se encuentra en el aminoácido D en la posición 340 (ver Figura 31), impidiendo el autoclivaje.

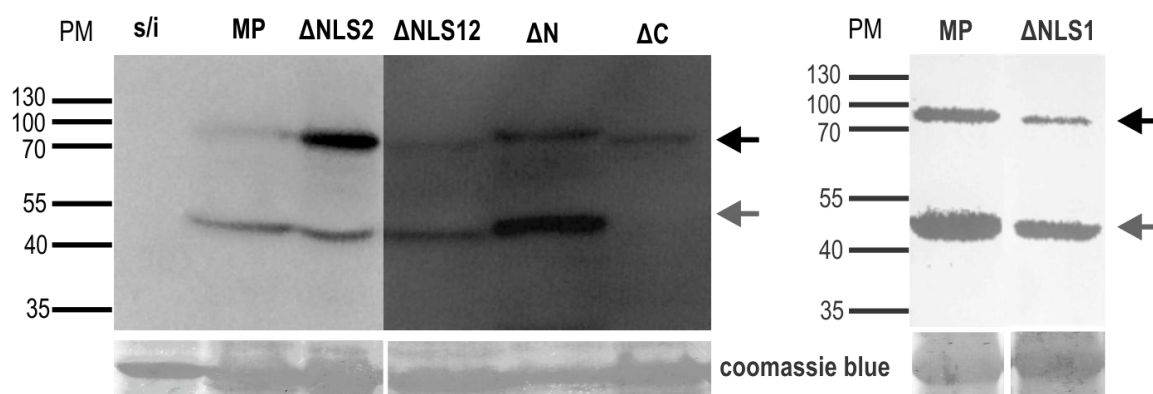


Figura 32. Análisis por *western-blot* de extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* expresando la MP wt y cada uno de los mutantes indicados a 3 dpi. Se reveló con anticuerpo monoclonal anti-GFP. La flecha negra señala las proteínas enteras y la flecha gris el péptido C-terminal producto del autoclivaje. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda. Como control de carga se usó el relevado de la membrana teñida con *coomassie blue*. s/i=extracto proteico de hojas no agroinfiltradas

3.2. Estudio de la localización subcelular de los mutantes de MP^{CPsV}

Se analizó la localización subcelular de los mutantes de MP^{CPsV} fusionados a eGFP mencionados y del mutante MP^{CPsV}D141A:eGFP por microscopía confocal. Se realizaron ensayos de expresiones transitorias en hojas de *N. benthamiana* de los mutantes conjuntamente con marcadores de distintos compartimientos celulares.

3.2.1. Localización nuclear y citoplasmática

Para analizar el efecto en las distintas mutaciones en la localización nuclear y citoplasmática de la MP^{CPsV}, se co-expresaron cada uno de los mutantes fusionados a eGFP junto con RFP libre usada como marcador de núcleo y citoplasma. Se analizó la co-localización por microscopía confocal luego de 3 dpi. Como se muestra en la Figura 33, paneles A-E, se encontró que los

mutantes MP^{CPsV}D141A, MP^{CPsV}ΔN:eGFP y MP^{CPsV}ΔNLS1_BP:eGFP se comportan de manera similar a la proteína wt MP:eGFP, conservando la localización nuclear. En el caso del mutante MP^{CPsV}ΔNLS2_BP:eGFP y en el doble mutante MP^{CPsV}ΔNLS1.2_BP:eGFP la acumulación en núcleo es mucho menor en comparación con la proteína wt (Figura 33, paneles A, F y G). Estos resultados indican que la secuencia predicha (KRDEYKKKMIENERIRR) entre los aminoácidos 255 y 271 de la MP^{CPsV} actuaría como señal funcional de direccionamiento nuclear, ya que cuando es eliminada, se afecta la localización nuclear de la proteína. Ya que de las dos NLS_BP encontradas en la MP^{CPsV}, la NLS1_BP es la que se conserva en la MP de los ophiovirus MiLBVV y LRNV, podemos especular que esa secuencia sería funcional en el direccionamiento a núcleo de estas dos MPs. Por el contrario, la secuencia predicha de la NLS1_BP no sería funcional, ya que cuando es eliminada la localización nuclear no se alteró. Además, no se observa un efecto aditivo cuando se mutan ambas NLS_BP en comparación con la mutación de la NLS2_BP (comparar paneles E y F, Figura 33).

Cuando se analiza el mutante MP^{CPsV}ΔC:eGFP no se observa localización nuclear de la proteína. Debido a que este mutante no tiene afectada la secuencia de la NLS2_BP, sería esperable encontrar esta proteína en el núcleo. En este caso, se podría especular que al perder el péptido C-terminal, la señal, aunque presente, no cumple su rol. En este mismo sentido, este mutante tampoco muestra actividad de auto-clivaje como ya fue mencionado, por lo que podría asociarse la capacidad de acumulación nuclear con el procesamiento de la proteína.

Los seis mutantes ensayados conservaron la localización citoplasmática en niveles similares a los de la proteína wt, mostrando que la estabilidad de las proteínas mutantes no se vio afectada en ese compartimiento.

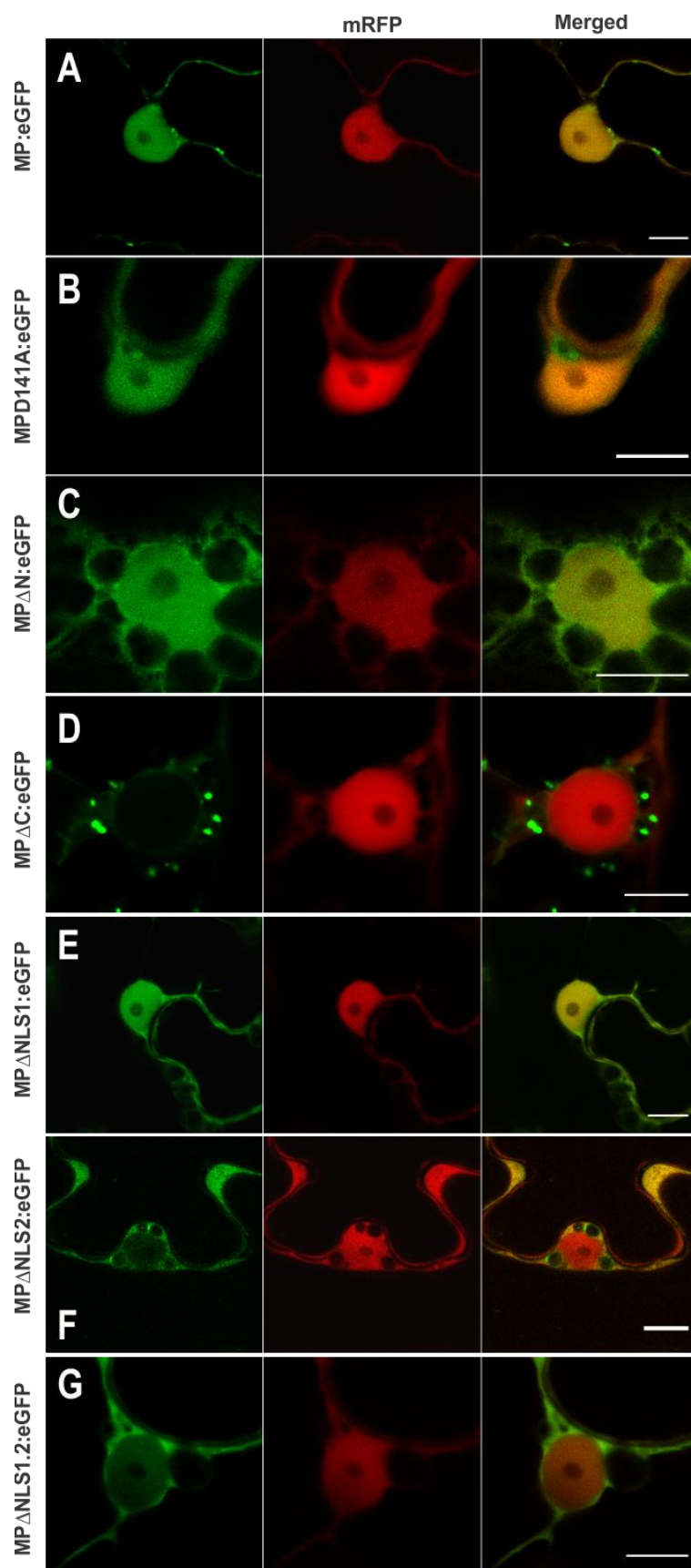


Figura 33. Localización subcelular de los mutantes de la proteína MPCPsV. Coexpresión del marcador de núcleo y citoplasma RFP con A) MPCPsV:eGFP, B) MPCPsVD141A:eGFP, C) MPCPsVΔN:eGFP, D) MPCPsVΔC:eGFP, E) MPCPsVΔNLS1_BP:eGFP, F) MPCPsVΔNLS2_BP:eGFP, G) MPCPsVΔNLS1.2_BP:eGFP. Escala=10μm.

3.2.2. Localización en plasmodesmos

La localización en PD de los mutantes se analizó co-expresando los mutantes fusionados a eGFP con el marcador de plasmodesmos PDCB1:mCherry (Simpson et al., 2009) (Figura 34).

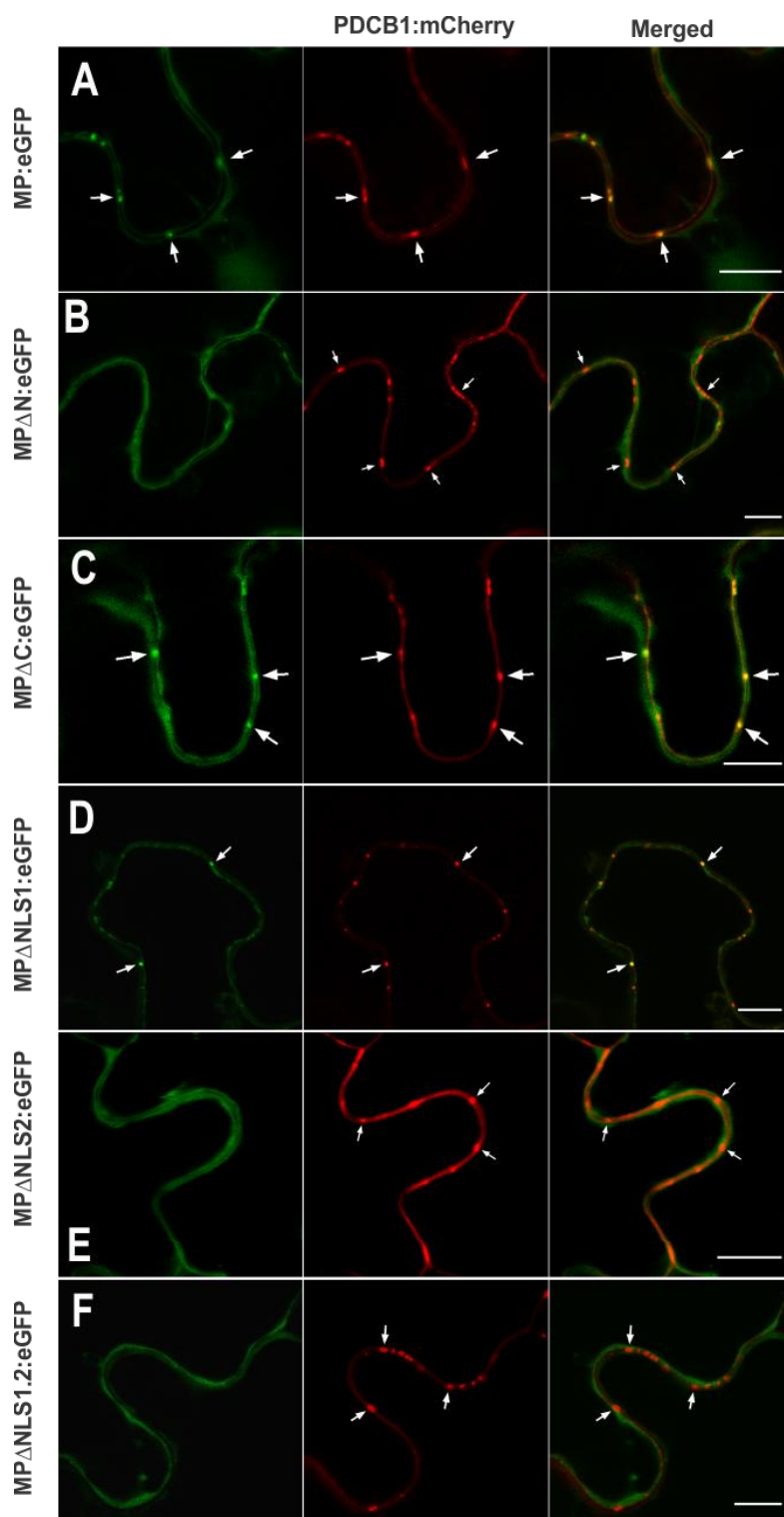


Figura 34. Localización en plasmodesmos de los mutantes de la proteína MP^{CPsV}. Coexpresión del marcador de plasmodesmos PDCB1:mCherry con A) MP^{CPsV}:eGFP, B) MP^{CPsV}ΔN:eGFP, C) MP^{CPsV}ΔC:eGFP, D) MP^{CPsV}ΔNLS1_BP:eGFP, E) MP^{CPsV}ΔNLS2_BP:eGFP, F) MP^{CPsV}ΔNLS1.2_BP:eGFP. Escala=10μm.

Luego de 2 a 3 dpai se analizó la localización por microscopía confocal, encontrándose que los mutantes MP^{CPsV}ΔC:eGFP, MP^{CPsV}ΔNLS1_BP:eGFP y MP^{CPsV}ΔNLS1.2_BP:eGFP mantienen la localización en PDs, por lo que ninguna de las regiones afectadas estaría involucrada en esta localización. Por el contrario, cuando se analizaron los mutantes MP^{CPsV}ΔN:eGFP y MP^{CPsV}ΔNLS2_BP:eGFP no se observó co-localización con PDCB1:mCherry en PD en ninguno de ellos. En el caso del mutante MP^{CPsV}ΔN, el resultado obtenido podría indicar la existencia de una posible PLS en los primeros 50 aminoácidos de la MP^{CPsV}, la cual es posible que sea funcionalmente similar a la descrita recientemente para la MP 30K de TMV (Yuan et al., 2016). Ninguno de los mutantes estudiados mostró capacidad para formar estructuras tubulares en los PDs.

3.2.3. Localización en cloroplastos

La clorosis es el síntoma más común causado por los virus en sus plantas hospedantes, que refleja una alteración en el proceso de fotosíntesis y cambios morfológicos en los cloroplastos. Se sabe que los virus afectan la estructura y función de los cloroplastos ocasionando en algunos casos, la inhibición de la actividad fotosintética de las células infectadas, lo que está directamente asociado con los síntomas de clorosis virales (Christov et al., 2007; Hall and Loomis, 1972; Herbers et al., 2000; Kyselakova et al., 2011; Mandahar and Garg, 1972; Owen, 1957a, b, 1958; Rahoutei et al., 2000). Se cree que la alteración de la fotosíntesis es una estrategia común y conservada por los virus de plantas para facilitar su infección y establecer un nicho óptimo (Gunasinghe and Berger, 1991). Se ha demostrado que diferentes componentes de los cloroplastos participan en varias etapas durante la infección viral. Se ha reportado que los cloroplastos están asociados con la replicación viral (Xiang et al., 2006), con los mecanismos de defensa frente a patógenos (Caplan et al., 2015; Caplan et al., 2008), y que participan en el mecanismo de movimiento viral (Bhat et al., 2013; Lim et al., 2010). Por ejemplo, la proteína TGB3 de Alternanthera mosaic virus (AltMV) contiene una señal de direccionamiento a cloroplastos que es esencial para el movimiento del virus, ya que cuando es mutada, se altera el movimiento célula a célula y larga distancia (Lim et al., 2010). Además, se ha demostrado que la proteína MP de Abutilon mosaic virus (AbMV) colocaliza e interacciona con la proteína de cloroplastos cpHSC70-1, y que el silenciamiento del gen *cpHSC70-1* afecta la estabilidad de los cloroplastos y causa una reducción significativa del movimiento de AbMV. Por lo que se ha propuesto que AbMV podría utilizar a cpHSC70-1 para transportarse por el estroma del cloroplasto hacia las células vecinas o desde los plástidos hacia el núcleo (Krenz et al., 2012). Diferentes factores virales pueden interaccionar y secuestrar componentes de los cloroplastos para favorecer el movimiento viral. Por ejemplo, la proteína P6 de CaMV está

asociada con los PDs e interacciona con la proteína de cloroplastos CHUP1. CHUP1 es una proteína asociada a la membrana de los tilacoides que media el movimiento de los cloroplastos por los microfilamentos en respuesta a la intensidad de la luz (Oikawa et al., 2003; Oikawa et al., 2008). El silenciamiento de *CHUP1* enlentece la formación de lesiones locales de CaMV (Angel et al., 2013), por lo que se ha sugerido que la proteína P6 podría mediar el movimiento intercelular de los complejos de replicación viral (VRCs) a los PDs por unión a CHUP1. Por último, las MPs de los tobamovirus Tomato mosaic virus (ToMV) y TMV se unen a RbCS (subunidad pequeña de la Rubisco) en los PDs. Cuando se silencia RbCS se reduce el movimiento intercelular y el transporte sistémico de ambos virus (Zhao et al., 2013), por lo tanto, se plantea que este secuestro de RbCS se trate de una estrategia común para el movimiento eficiente de los tobamovirus.

Los cloroplastos también están involucrados en la respuesta de defensa contra patógenos. Esta organela es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) y es el lugar donde se sintetiza ácido salicílico, la hormona de defensa primaria involucrada en la resistencia local y sistémica de la planta. Así mismo, la síntesis de otras hormonas vegetales, como el ácido jasmónico y el ácido abscísico, está estrechamente regulada por la maquinaria de los cloroplastos. Como ejemplo, la proteína TGB1L88 (proteína TGB1 con fuerte actividad silenciadora) de AltMV interacciona selectivamente con la β ATPasa del cloroplasto y provoca una respuesta de defensa (Seo et al., 2014).

Sabiendo que la proteína MP^{CPsV} se ha visto localizada en cloroplastos (Robles Luna, 2014) y que posiblemente esta asociación sea fundamental para el ciclo viral de CPsV y en particular para la acción de su MP, se realizaron observaciones de los cloroplastos de células expresando cada uno de los mutantes de MP generados, cuyos resultados se muestran en la Figura 35.

Como se observa, la MP^{CPsV} forma agregados que se encuentran en los cloroplastos (panel A), estos agregados también son observados durante la expresión de los mutantes $MP^{CPsV}D141A$, $MP^{CPsV}\Delta C$ y $MP^{CPsV}\Delta NLS2_BP$ (paneles B, D y F), mientras que los mutantes $MP^{CPsV}\Delta N$, $MP^{CPsV}\Delta NLS1_BP$ y $MP^{CPsV}\Delta NLS1.2_BP$ no presentan esa capacidad (paneles C, E y G). En el caso del mutante $MP^{CPsV}\Delta N$, probablemente sea el resultado de eliminar el péptido de direccionamiento a cloroplastos (cTP) que se encuentra en esta región, predicho por el servidor ChloroP. Otra hipótesis sería que este mutante y los mutantes $MP^{CPsV}\Delta NLS1_BP$ y $MP^{CPsV}\Delta NLS1.2_BP$ pierdan la localización en cloroplastos por pérdida de interacción con algún factor celular o por la disminución de la acumulación nuclear en el caso de $MP^{CPsV}\Delta NLS1.2_BP$, la cual podría ser un paso previo a la localización en cloroplastos en el ciclo infectivo.

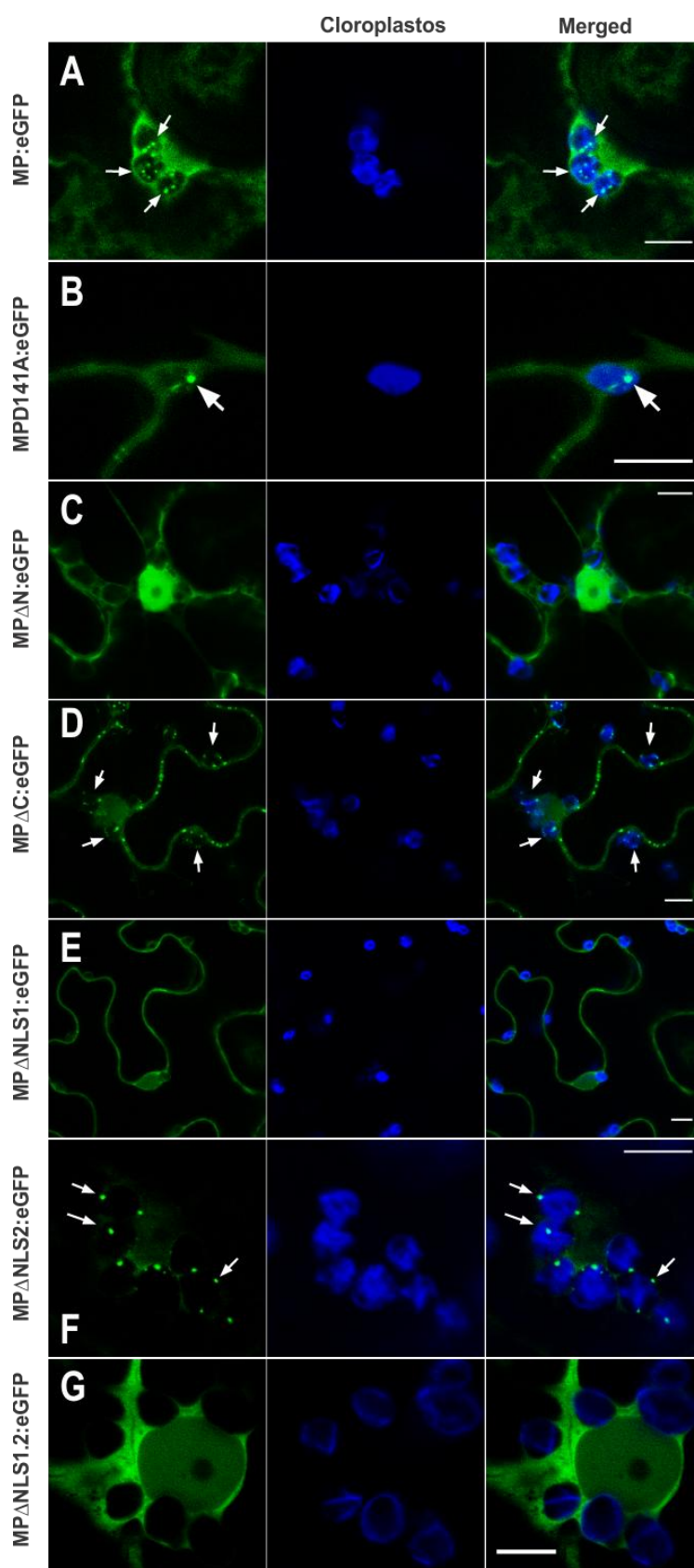
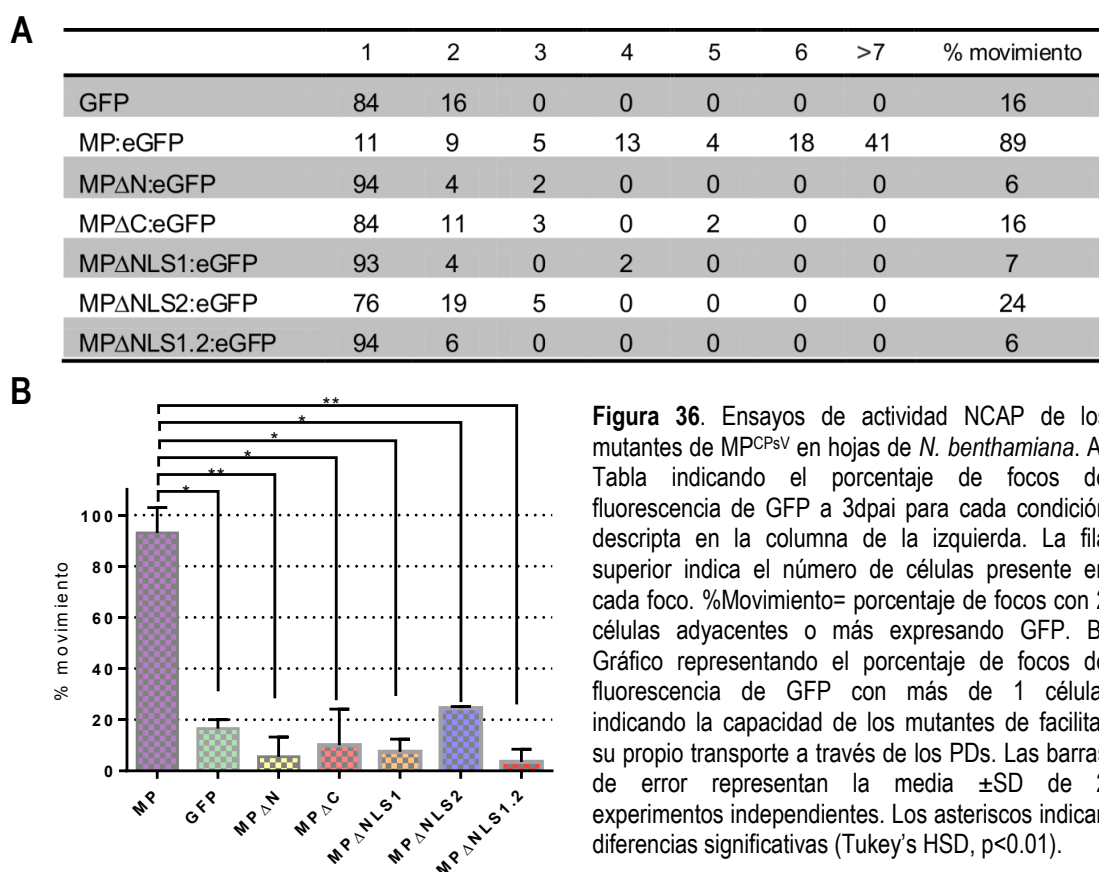


Figura 35. Localización en cloroplastos. Expresión transitoria en *N. benthamiana* de: A) $MP^{CPsV}:eGFP$, B) $MP^{CPsV}D141A:eGFP$, C) $MP^{CPsV}\Delta N:eGFP$, D) $MP^{CPsV}\Delta C:eGFP$, E) $MP^{CPsV}\Delta NLS1_BP:eGFP$, F) $MP^{CPsV}\Delta NLS2_BP:eGFP$, G) $MP^{CPsV}\Delta NLS1.2_BP:eGFP$. En azul se marcan los cloroplastos. Las flechas indican agregados de MP en cloroplastos. Escala=10 μ m.

3.3. Estudio de la capacidad de los mutantes de MP^{CPsV} para incrementar el SEL de los PDs

Con el fin de determinar el efecto de los diferentes dominios de la MP^{CPsV} que estarían involucrados en la capacidad de esta proteína de incrementar el SEL de los PDs y permitir su propio movimiento intercelular, se ensayó la actividad NCAP de los mutantes como se explicó en el capítulo 1. En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos. Se encontró que si bien ninguno mantuvo niveles significativos de actividad NCAP en comparación con la proteína MP wt, se observan diferencias en la distribución de focos de fluorescencia con diferente cantidad de células para cada mutante. Los mutantes MP^{CPsV}ΔN, MP^{CPsV}ΔNLS1_BP y MP^{CPsV}ΔNLS1.2_BP fueron los que mostraron menor capacidad NCAP, sólo un 6-7% de focos de dos células, incluso menor que el control negativo que presentó un 16% de focos de dos células. El mutante MP^{CPsV}ΔC, mostró un porcentaje de movimiento similar al control negativo, sin embargo, se observa la presencia de focos de 3 y 5 células, nunca encontrados en el control negativo. El mutante MP^{CPsV}ΔNLS2_BP mostró un 24% de movimiento, algo mayor al control negativo, pero esta diferencia (16% y 24%) no parece ser estadísticamente significativa.



Estos resultados, junto con el resultado del mutante MP^{CPsV}D141A el cual también pierde la capacidad NCAP (ver capítulo 1), nos indican que en la MP esta actividad no estaría asociada a un dominio proteico en particular, si no que probablemente sea producto de una interacción

compleja con factores del hospedante, donde es necesario que se conserven la totalidad de los motivos y dominios que conforman la proteína completa.

3.4. Estudio de la actividad de movimiento célula a célula de los mutantes de MP^{CPsV}

Por último, se analizó la capacidad de los mutantes de transcomplementar el movimiento del virus TMVΔMPΔCP-GFP descrito en el capítulo 1. Se realizaron ensayos de transcomplementación del movimiento del virus TMVΔMPΔCP:GFP con los distintos mutantes de MP^{CPsV} fusionados traduccionalmente a mRFP (Figura 37). Se coexpresó el virus reportero TMVΔMPΔCP:GFP junto con las MPs mutantes en una mitad de hoja de *N. benthamiana*, o junto con mRFP libre (como control negativo) o la correspondiente MP sin mutar (como control positivo) en la otra mitad de la hoja. Luego de 7 dpai, se analizó la presencia de focos de fluorescencia de GFP mediante iluminación de las hojas con lámpara UV. Se observó que los mutantes MP^{CPsV}ΔN, MP^{CPsV}ΔNLS1_BP, MP^{CPsV}ΔNLS2_BP y MP^{CPsV}ΔNLS1.2_BP se comportaron de manera similar al control negativo, ya que sólo se observaron focos de fluorescencia puntuales de una única célula. En cambio, cuando se analizaron las hojas que expresaban el mutante MP^{CPsV}ΔC, si bien la mayoría de los focos de fluorescencia fueron puntuales, se observaron algunos de mayor tamaño y, debido a la baja expresión de este mutante *in planta* (ver Figura 38), se podría especular que, aún con esa expresión el mutante mantendría la capacidad de mover el genoma de TMV a las células adyacentes. Esto es, debido a la baja expresión, es probable que en muchas células donde se encuentre TMV no haya expresión suficiente del mutante para complementar el movimiento, lo que luego se lee con un número alto de focos de sólo 1 o 2 células.

En la Figura 38 se muestra un ensayo de *western blot* de los extractos proteicos de las hojas del ensayo de transcomplementación mostrado en la Figura 37, revelado con anticuerpo anti-RFP. Se puede observar que luego de 7 dpai, tanto la MP wt como los mutantes MP^{CPsV}ΔN, MP^{CPsV}ΔNLS1_BP, MP^{CPsV}ΔNLS2_BP están mayoritariamente clivados, ya que la banda correspondiente a la proteína completa (sin clivar) es muy tenue (en MP wt y MP^{CPsV}ΔNLS2_BP) o no se detecta (en MP^{CPsV}ΔN y MP^{CPsV}ΔNLS1_BP). Por el contrario, en el mutante MP^{CPsV}ΔC sólo se observa la banda correspondiente a la proteína completa mutada, indicando que este mutante tampoco es capaz de clivarse a tiempos más largos de expresión (7 dpai). Estos resultados nos indican que el clivado de la proteína no sería requisito funcional para la capacidad de la MP de mover el genoma de TMV a las células adyacentes.

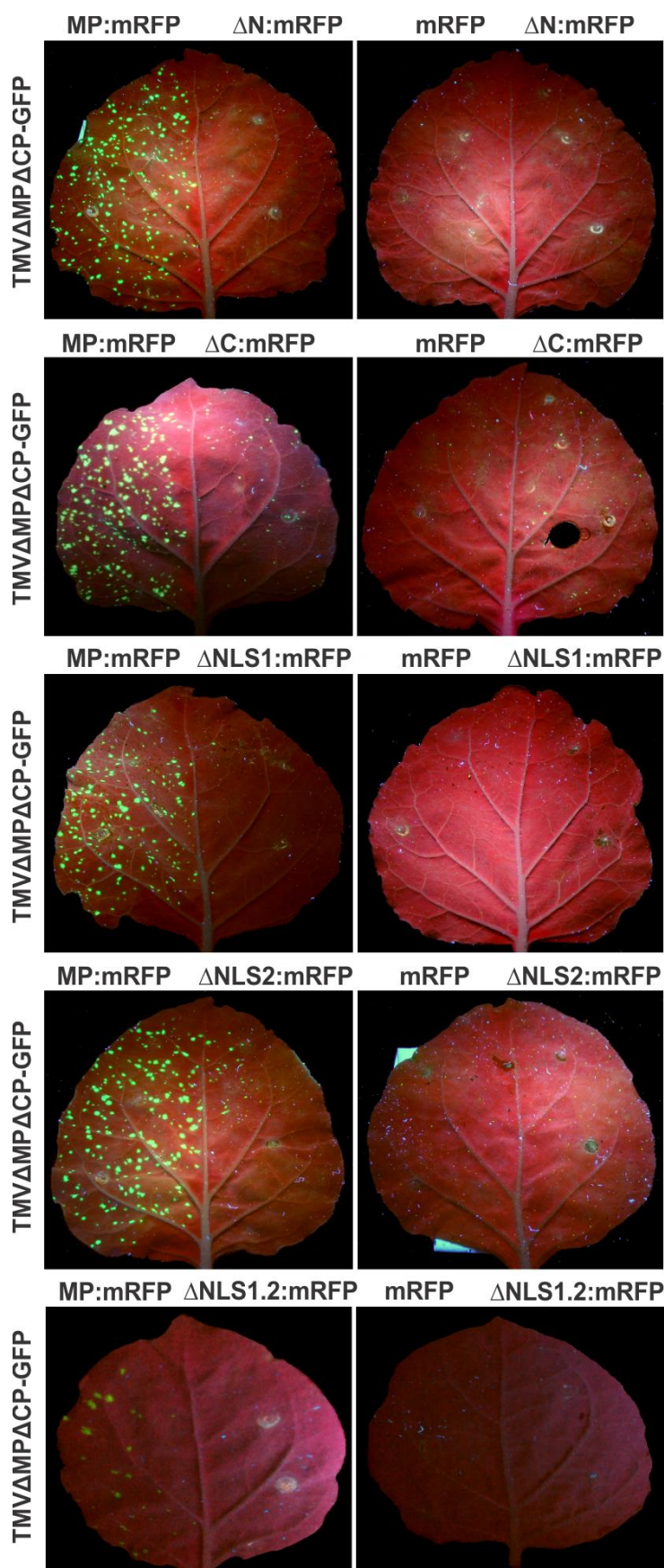


Figura 37. Ensayos de transcomplementación del movimiento de TMV Δ MP Δ CP:GFP con los mutantes de MP^{CPsV} en hojas de *N. benthamiana* a 7 dpi. Imágenes representativas de hojas coexpresando TMV Δ MP Δ CP:GFP y las proteínas indicadas.

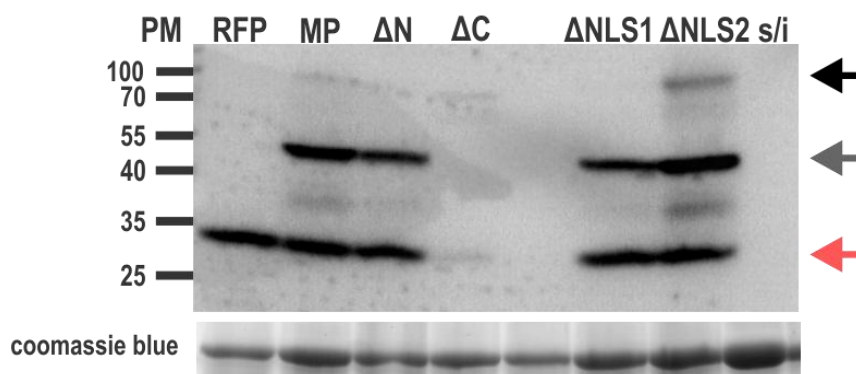


Figura 38. Ensayo de *western blot* de los extractos proteicos obtenidos de las hojas del experimento de la Figura 37 a 7dpi revelado con anticuerpo anti-RFP. La flecha negra señala las proteínas enteras, la flecha gris el péptido C-terminal producto del autoclivaje y la flecha roja la proteína mRFP libre.

En conjunto, estos resultados nos indican que la función de movimiento célula a célula de la MP sería independiente de su capacidad de localizarse en núcleo, ya que el mutante $MP^{CPsV}\Delta C$ sería capaz de complementar el movimiento de $TMV\Delta MP\Delta CP-GFP$ y no se localiza en núcleo. Además, si bien el tráfico de la MP a los PD es necesario para que cumpla con su función como proteína de movimiento, los dominios intervinientes serían independientes, ya que los mutantes $MP^{CPsV}\Delta NLS1_BP$ y $MP^{CPsV}D141A$ son capaces de localizarse en PD pero no son funcionales para transcomplementar a $TMV\Delta MP\Delta CP-GFP$. El resultado obtenido con el mutante $MP^{CPsV}\Delta C$ nos indica que el dominio C-terminal, y por ende tampoco su procesamiento, serían necesarios para la función de movimiento célula a célula de $TMV\Delta MP\Delta CP-GFP$. Debido a que este mutante pierde la capacidad para formar túbulos en los PDs, pero mantiene la capacidad de transcomplementar a $TMV\Delta MP\Delta CP-GFP$, nos indica que este virus-vector no depende estrictamente de esas formaciones para su movimiento en *N. benthamiana*. Por último, un resultado muy interesante surge de los mutantes $MP^{CPsV}\Delta NLS1_BP$, el cual pierde la capacidad de formar agregados en cloroplastos y de transcomplementar a $TMV\Delta MP\Delta CP-GFP$, lo que indicaría que el paso de la MP por cloroplastos sería un requisito para cumplir con sus actividades de movimiento.

Cabe aclarar que si bien otro de los objetivos de este trabajo era analizar el efecto de las mutaciones en la actividad supresora de la MP^{CPsV} , la baja actividad supresora encontrada para ésta proteína en los ensayos disponibles hasta el momento, haría difícil la detección de cambios notables en el efecto supresor de los mutantes mediante los ensayos clásicos de supresión, por lo que no fue abordado en este estudio.

Resumen de los resultados obtenidos con los mutantes de MP^{CPsV}

En la siguiente tabla se compilan los resultados de los ensayos de localización subcelular, actividad NCAP y capacidad de facilitar el movimiento célula a célula del virus mutante TMVΔMPΔCP-GFP. Se han agregado los resultados obtenidos con el mutante MP^{CPsV}D141A, algunos de los cuales se desarrollaron en el capítulo 1.

	MP	ΔN	ΔC	ΔNLS1_BP	ΔNLS2_BP	ΔNLS1.2_BP	D141A
Clivado	+	+	-	+	+	+	+
Plasmodesmos	+	-	+	+	-	-	↓↓
Túbulos en PD	+	-	-	-	-	-	-
Núcleo	+	+	-	+	↓↓↓	↓↓↓	+
Citoplasma	+	+	+	+	+	+	+
Cloroplastos	+	-	↑	-	+	-	↓
Microtúbulos	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
Actividad NCAP	+	-	-	-	-	-	-
Movimiento de TMVΔMPΔCP-GFP	+	-	↓↓↓	-	-	-	-

Tabla 1. Compilado de los resultados obtenidos con los mutantes de MP^{CPsV}. Las flechas indican reducción (↓) o aumento (↑) de la actividad observada en el mutante en relación a la observada en la proteína *wt*. nd=no determinado

CONCLUSIONES

- El direccionamiento de la MP^{CPsV} al núcleo depende de la presencia de una señal de localización nuclear bipartita (NLS_BP) entre los aminoácidos 255 y 271.
- La MP^{CPsV} contiene una señal de direccionamiento a PD (PLS) presente en la región amino terminal.
- La MP^{CPsV} contiene un péptido de tránsito a cloroplastos (cTP) en la región amino terminal.
- La región C-terminal de la MP^{CPsV} es necesaria para el auto-clivaje de la proteína.
- El clivado de la proteína es necesario para su localización nuclear.
- La localización nuclear no sería requerida para la función de movimiento célula a célula.
- El tráfico hacia el PD es esencial para que la MP cumpla con sus funciones como proteína de movimiento viral.
- La capacidad de MP de acumularse en plasmodesmos es independiente de su actividad de movimiento.
- El tránsito de la MP por los cloroplastos parece ser necesario para su función de movimiento.
- La capacidad NCAP de la MP resultó afectada en todos los mutantes ensayados.
- No se detectó un dominio proteico asociado a la capacidad de la MP de formar túbulos en los PDs
- La capacidad de movimiento de la MP es independiente de su capacidad de formar estructuras tubulares en los PDs.
- La región C-terminal de la MP no es esencial para la función de movimiento célula a célula.

DISCUSIÓN

Para establecer la infección de sus hospedantes, los virus deben lograr dirigir sus componentes virales a los compartimentos subcelulares adecuados para lograr la replicación y luego el tráfico desde las células inicialmente infectadas a las células vecinas, y de allí a los órganos distantes. Por lo tanto, el conocimiento de la localización subcelular de las proteínas virales en una célula infectada, es de gran utilidad para el estudio de sus funciones y mecanismos virales.

Para ampliar el conocimiento sobre los virus y sus proteínas, en particular de sus localizaciones subcelulares y dominios funcionales, actualmente se cuenta con enfoques y herramientas bioinformáticas de gran utilidad, principalmente para enfocar y diseñar los experimentos que lo confirmen. Así mismo, como es inevitable que se produzcan asignaciones falsas por los métodos computacionales, debe existir un fuerte grado de complementariedad entre el uso de métodos experimentales y herramientas computacionales que puedan marcar con certeza la probabilidad de que una proteína pertenezca a un compartimento dado o cumpla con una determinada función.

De esta manera, para lograr identificar dominios funcionales presentes en la MP de CPsV, se realizó un análisis exhaustivo de su secuencia proteica, encontrándose por varios métodos de predicción, regiones posiblemente involucradas tanto en su localización subcelular como en su actividad. Se encontró que la MP^{CPsV} contiene una NLS_BP funcional entre los aminoácidos 255 y 271, que además se conserva en la MP de los ophiovirus MiLBVV y LRNV, mientras que la NLS1_BP putativa (aa 86 a 102) no tendría esa capacidad. Se encontró que la región amino terminal de la proteína está involucrada en el direccionamiento a cloroplastos, por lo cual es altamente probable que esta región albergue un cTP funcional. La biosíntesis de las dos principales hormonas encargadas de regular las defensas de las plantas frente a los virus, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), se realiza mayoritariamente por enzimas presentes en los cloroplastos, codificadas por genes nucleares (Boatwright and Pajerowska-Mukhtar, 2013; Schaller and Stintzi, 2009; Seyfferth and Tsuda, 2014; Wasternack, 2007; Wasternack and Hause, 2013). Por lo tanto, tanto el núcleo como los cloroplastos están ampliamente involucrados en las defensas antivirales de las plantas. Los resultados obtenidos con el mutante MP^{CPsV}ΔNLS1_BP nos indican que la MP necesitaría atravesar los cloroplastos para poder llevar a cabo sus actividades de movimiento.

En cuanto a la localización en PDs, los resultados con el mutante MP^{CPsV}ΔN indican la presencia de una PLS funcional en la región N-terminal de la MP. Combinando los resultados de las localizaciones en PDs y las actividades de movimiento de los mutantes estudiados, podemos afirmar que se tratarían de funciones independientes de la MP, apoyando también las observaciones de Heinlein (2015). Además, podemos afirmar que la formación de túbulos de

MP^{CPsV} en los PDs no indica necesariamente una dependencia de éstos para el movimiento. Algo similar se ha descrito para la MP de CMV, la cual puede formar túbulos, pero estas estructuras no son necesarias para el movimiento viral célula a célula (Canto and Palukaitis, 1999b).

Encontramos que la región C-terminal es necesaria para que la proteína se clive (conserva la actividad proteásica), y que este procesamiento está ligado a la localización nuclear de la MP^{CPsV}. Sin embargo, la función de movimiento célula a célula de la MP no estaría ligada con su localización nuclear y de autoclivaje. Así mismo, se determinó que la región carboxilo terminal no sería estrictamente necesaria para la función de movimiento célula a célula de la MP^{CPsV}, ya que cuando se elimina, aunque en forma ineficiente, el mutante mantiene la capacidad de facilitar el movimiento intercelular del virus TMVΔMPΔCP-GFP.

La observación de que las MPs 30K, y en particular las MP de los ophiovirus, comparten relativamente poca similitud de secuencia pero que poseen un rol común, es consistente con la hipótesis de que las funciones compartidas por estas MPs, surgen posiblemente de estructuras similares, y así, cada dominio homólogo estaría a cargo de las mismas actividades en todas las MP 30K. Los resultados obtenidos con los mutantes de delección, donde parece afectarse la función de la proteína mediante la interrupción de sus dominios, indican que la estructura de estos dominios, y no tanto los aminoácidos específicos dentro de éstos, sería importante para la actividad de la proteína.

Si bien el uso de fusiones traduccionales de la MP^{CPsV} a proteínas fluorescente permiten el estudio de la localización subcelular *in vivo*, la presencia de la proteína marcadora o *tag* puede interferir con las secuencias o señales estructurales necesarias para dirigir la proteína a su compartimento adecuado, e incluso con su función. Por lo tanto, podrían existir localizaciones de la MP^{CPsV} que no hemos identificado. Así mismo, las localizaciones subcelulares de la MP^{CPsV} en el contexto de la infección viral podrían ser diferentes a las observadas en los ensayos realizados. El uso de *softwares* de predicción de localización por homología global de secuencia, tiene la ventaja de dar la oportunidad de predecir localizaciones subcelulares cuando las señales de direccionamiento no se conocen o la información es insuficiente para definir las adecuadamente. Ejemplos de estos programas lo constituyen WoLFPSORT (Horton et al., 2007), Virus-PLoc (Shen and Chou, 2007) y iLoc-Virus (Xiao et al., 2011). Cuando se analizan las secuencias de las MPs de los ophiovirus con estos programas, se encuentra homología con proteínas de mitocondria, además de proteínas con localización nuclear, citoplasmática, y de cloroplastos. Por lo que es probable que la MP de los ophiovirus también se localice en este compartimento.

El software HHPred, encuentra homología remota de la región carboxilo terminal con varias aspartil proteasas virales. Además, el software Epestfind para la identificación de secuencias PEST (secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)), predijo tres posibles sitios de clivaje proteolítico. Los motivos PEST parecen reducir las vidas medias de las proteínas y, por lo tanto, se asocian con proteínas que tienen una vida media celular corta. Se hipotetiza que las secuencias PEST actúan como péptido señal para la degradación proteolítica. Según resultados recientes de nuestro grupo de trabajo, la proteína MP^{CPsV} se cliva parcialmente *in vivo* tanto durante la infección en *C. quinoa* y *Nicotiana occidentalis* como en expresiones transitorias de la MP^{CPsV} fusionada a distintos *tags* (epítipo FLAG, eGFP y mRFP) en *N. benthamiana* (Robles Luna, comunicación personal). En el capítulo 1 se describió la presencia del tripéptido ‘DTG’ en la secuencia de la MP^{CPsV}, se sabe que este motivo está conservado en proteínas con actividad aspartil proteasa eucarióticas y retrovirales (Hull, 2014a; Torruella et al., 1989). Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que este motivo es funcional y responsable de la actividad de corte catalítico de la MP^{CPsV} (Robles Luna et al., 2017a). Debido a que es altamente probable que este clivado cumpla un rol efectivo en el ciclo viral, tanto las localizaciones observadas como las actividades de la MP podrían no estar asociadas con la proteína completa, sino con las versiones clivadas de la proteína. Por ejemplo, los resultados de localización subcelular del mutante MP^{CPsV}ΔC sugieren que la proteína requeriría de un auto clivaje previo para localizarse en núcleo, ya que este mutante no se cliva ni se localiza en núcleo. Así mismo, se dificulta sacar conclusiones en cuanto a la pérdida de función del mutante MP^{CPsV}ΔC, ya que la misma puede deberse a que la región mutada está directamente asociada con la función, o a que se está alterando el dominio de auto clivaje afectando indirectamente la función de la proteína.

PERSPECTIVAS

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la MP^{CPsV} es capaz de interactuar de manera homóloga con otras MP^{CPsV}, y heteróloga con su CP^{CPsV} y con las proteínas PDLPs (Robles Luna et al., 2013). Por lo tanto, con el fin de continuar con la caracterización de los dominios funcionales de la MP^{CPsV}, se analizará la presencia de dominios de unión MP^{CPsV}-MP^{CPsV}, MP^{CPsV}-CP^{CPsV} y MP^{CPsV}-PDLP mediante ensayos de coimmunoprecipitación y FRET. Se ha demostrado que la región C-terminal de varios miembros de la superfamilia 30K de proteínas de movimiento viral, interactúan con la correspondiente CP (Aparicio et al., 2010; Berna et al., 1991; Carvalho et al., 2003; Kim et al., 2004; Nagano et al., 1997; Sanchez-Navarro and Bol, 2001; Takeda et al., 2004). Por lo tanto, resulta de especial interés determinar si la región C-terminal de la MP de CPsV está involucrada en la interacción heteróloga CP^{CPsV}-MP^{CPsV} (Robles Luna et al., 2013).

También se analizará la capacidad de los mutantes de incrementar la degradación de calosa, ya que es un mecanismo por el cual las MPs incrementan el SEL de los PDs, mediante reclutamiento de β -1,3-glucanasas que degradan la calosa acumulada en el cuello de los PDs. De esta forma, podríamos lograr separar dominios de direccionamiento y acumulación en PD de los distintos dominios funcionales.

Además, se completarán los estudios de localización en microtúbulos de los mutantes, ya que sólo se analizó la localización del mutante MP^{CPsV} Δ N, el cual se comporta de manera similar a la MP wt (datos no mostrados).

Las secuencias de localización nuclear pueden ser muy útiles para dirigir moléculas heterólogas al núcleo. Debido a que la NLS2_BP es funcional en la localización nuclear de MP^{CPsV}, se probará si esta NLS fuera funcional para mover una proteína heteróloga al núcleo. Para esto, se realizará una fusión de la secuencia NLS2_BP a la proteína viral CP^{CPsV}:eGFP, la cual no se localiza en núcleo. En cuanto a la NES predicha por el servidor NetNES, se generará un mutante por delección de los aminoácidos 79 a 90, el cual, de ser funcional la NES, se espera que se acumule en núcleo en niveles superiores a la proteína wt.

Así mismo, sería de sumo interés lograr identificar los dominios de interacción a dsRNA de la MP^{CPsV}, que pudieran estar directamente asociados con la función de movimiento y/o supresión. Para esto, se analizará si existe pérdida de tal interacción en alguno de los mutantes desarrollados.

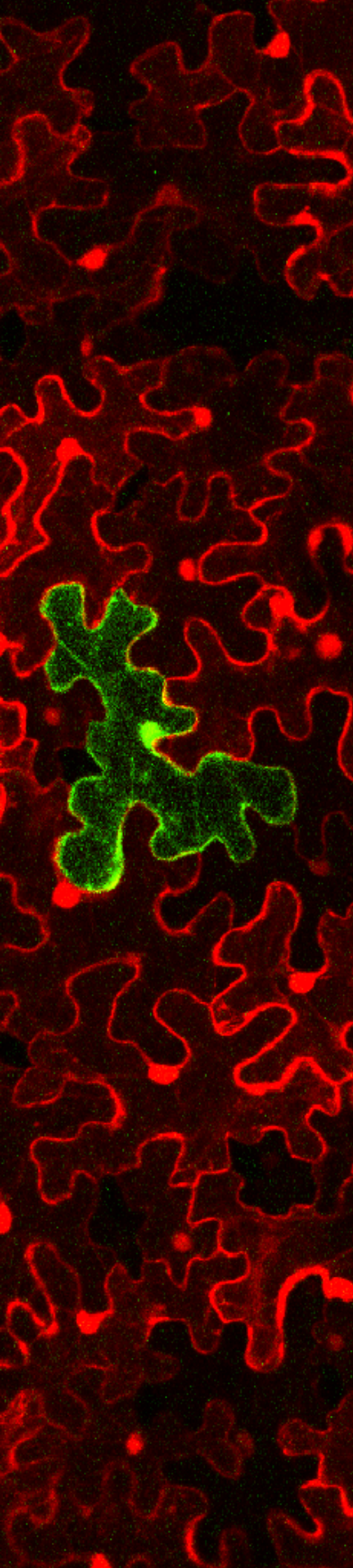
Otra de las cuestiones relevantes que se pretende abordar en un futuro es el mapeo de la posible señal de direccionamiento a plasmodesmos presente en el extremo amino terminal de MP^{CPsV}, ya que poco es lo que se conoce acerca de estas señales. Por lo tanto, se podrían

fusionar distintas porciones de la región N-terminal de la secuencia de MP^{CPsV} a GFP y se evaluará la mínima secuencia capaz de localizar la proteína GFP en PDs.

Se continuará con el estudio de la localización de la MP^{CPsV} en cloroplastos, ya que se ha encontrado asociación directa entre este compartimento y los mecanismos de defensa del hospedante frente a patógenos, así como también con el movimiento viral. Por lo tanto, para lograr asociar la localización en cloroplasto con la función, se generará un mutante donde se elimine el péptido de tránsito a cloroplastos (cTP) putativo, sin afectar ninguna otra localización, y se evaluará su efecto en las funciones de movimiento, y su capacidad de interacción con distintas proteínas celulares (ver capítulo 5). Debido a que el cTP podrían estar parcialmente solapado con la PLS, se realizarán mutaciones puntuales o deleciones cortas, de manera de poder delimitar ambos motivos.

Varias evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio, indican que la MP^{CPsV} formaría estructuras de tipo tubulares en los PDs de hojas de *N. benthamiana* expresando transitoriamente MP^{CPsV}:eGFP o en tejido de *C. sinensis* infectado con CPsV (Robles Luna et al., 2017a). Estas estructuras serían similares a los túbulos de movimiento formados por las MP de TSWV y GFLV, lo que sugiere que CPsV utilizaría este mecanismo de formación de túbulos para transportarse intercelularmente, al menos en estos dos hospedantes. Por lo tanto, sería interesante analizar los dominios de la MP^{CPsV} involucrados en la formación de estas estructuras en los PDs.

Además, en el caso de algunos dominios que resulten de mayor interés se continuará con el diseño de nuevos mutantes para ampliar la caracterización de los dominios y/o posiciones funcionales de las MP de los ophiovirus. El servidor ConSurf (Glaser et al., 2003), es una herramienta bioinformática muy útil para estimar la conservación evolutiva de los aminoácidos de una proteína, que se basa en las relaciones filogenéticas entre secuencias homólogas (Mayrose et al., 2004; Pupko et al., 2002). El grado en que una posición de aminoácido se conserva de forma evolutiva, depende fuertemente de su importancia estructural y funcional. Las posiciones que evolucionan rápidamente son variables, mientras que las que lo hacen de forma más lenta se conservan. Una de las ventajas de ConSurf en comparación con otros métodos, es el cálculo exacto de la tasa evolutiva utilizando un método Bayesiano empírico o un método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML) (Pupko et al., 2002). Por lo tanto, el análisis de la conservación de las posiciones entre miembros de la familia 30K, y en particular entre los ophiovirus, podría revelar la importancia de cada posición para la estructura y/o función de la proteína.



CAPÍTULO 3

Análisis de dominios de la
proteína 24K de CPsV
involucrados en las funciones
de supresión y movimiento viral

INTRODUCCIÓN

1. La proteína 24K de CPsV

El RNA 1 de CPsV codifica en su extremo 5' para la proteína más pequeña del genoma, de aproximadamente 24kDa, denominada proteína 24K. Hasta el momento, se ha encontrado que esta proteína interfiere en el procesamiento de miRNAs, está involucrada en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional y se une a dsRNA de tamaños largos, pero no a RNAs pequeños (Robles Luna et al., 2017b). Como se señala en la Figura 39, análisis previos por CLSM de expresiones transitorias de esta proteína fusionada a proteínas fluorescentes en células epiteliales de *N. benthamiana* han mostrado localización nuclear, nucleolar, citoplasmática y en filamentos en la región cortical de la célula, y más específicamente, en forma de agregados en el nucleoplasma, los cuales no han sido caracterizados hasta el momento (Robles Luna, comunicación personal). La localización de la proteína 24K en estos agregados podría ser parte tanto del mecanismo de supresión del silenciamiento génico llevado a cabo por CPsV para regular la expresión de su genoma, como del mecanismo utilizado para moverse a larga distancia y lograr la infección sistémica de sus hospedantes.

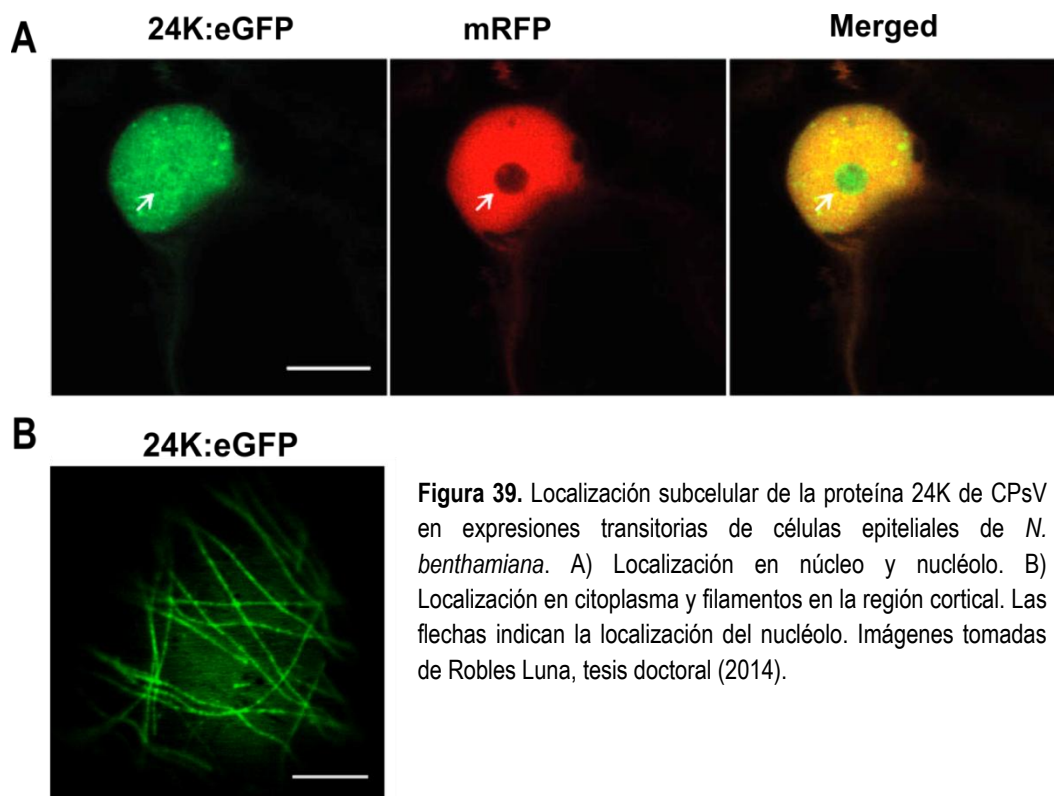


Figura 39. Localización subcelular de la proteína 24K de CPsV en expresiones transitorias de células epiteliales de *N. benthamiana*. A) Localización en núcleo y nucléolo. B) Localización en citoplasma y filamentos en la región cortical. Las flechas indican la localización del nucléolo. Imágenes tomadas de Robles Luna, tesis doctoral (2014).

Se han reportado varias evidencias que remarcan la importancia de la localización de proteínas virales en núcleo y nucléolo tanto para la supresión del silenciamiento génico como para el mecanismo de movimiento viral a larga distancia. En las siguientes secciones se detallarán algunas de ellas.

2. Silenciamiento antiviral de RNA

El silenciamiento de RNA (silenciamiento génico) es una estrategia común compartida por los organismos eucariotas que juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo, en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y en la respuesta al estrés ambiental (Assaad et al., 1993; Boerjan et al., 1994). Este mecanismo se desencadena por RNA bicatenario (dsRNA) y provoca la inactivación, de manera secuencia-específica, de la expresión de genes que contienen secuencias idénticas o muy similares al dsRNA que dio inicio al silenciamiento. El silenciamiento génico se induce típicamente en respuesta a la presencia de estructuras de RNA aberrantes (tales como RNA de doble cadena o RNA con estructuras de tipo *hairpin*) que pueden surgir de genes endógenos, infección por virus o transgenes introducidos. Estos RNAs aberrantes adoptan estructuras dsRNA, o se sintetizan por RNA polimerasas de la célula o RdRp virales, y luego son clivados en dsRNAs de 21-24 nucleótidos por enzimas de tipo RNasaIII denominadas *Dicer-like* (DCL) (Mallory and Vaucheret, 2010; Pumplin and Voinnet, 2013). Luego de este procesamiento, se incorpora una de las dos cadenas del RNA pequeño generado por las DCL, a un complejo silenciador denominado RISC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*), que será el que guíe la inactivación secuencia específica del RNA o DNA blanco. Estos complejos RISC de silenciamiento están compuestos, entre otras, por la proteína Argonauta (AGO).

Además de su papel en el desarrollo y mantenimiento de la integridad del genoma, el silenciamiento del RNA constituye el principal sistema inmune de la planta contra los virus (Covey et al., 1997; Ding and Voinnet, 2007; Incarbone and Dunoyer, 2013; Ratcliff et al., 1997). El silenciamiento antiviral de RNA es desencadenado por dsRNA que surgen durante la infección viral (intermediarios de replicación o por estructuras de tipo *hairpin* dentro de los genomas de virus a ssRNA) (Donaire et al., 2009; Molnar et al., 2005; Qi et al., 2009; Szitty et al., 2010). Estos RNA virales de doble cadena son principalmente procesados por DCL4 o DCL2, para producir sRNAs de 21 o 22 nt derivados del virus (vsRNAs) (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006). Estos vsRNAs son luego reclutados a los RISCs, principalmente por AGO1 y AGO2, para dirigir el PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) del RNA viral (Harvey et al., 2011; Morel et al., 2002; Qu et al., 2008; Scholthof et al., 2011; Takeda et al., 2008; Wang et

al., 2011b; Zhang et al., 2006). La Figura 40 presenta un esquema del mecanismo llevado por varios tipos de virus de plantas estudiados.

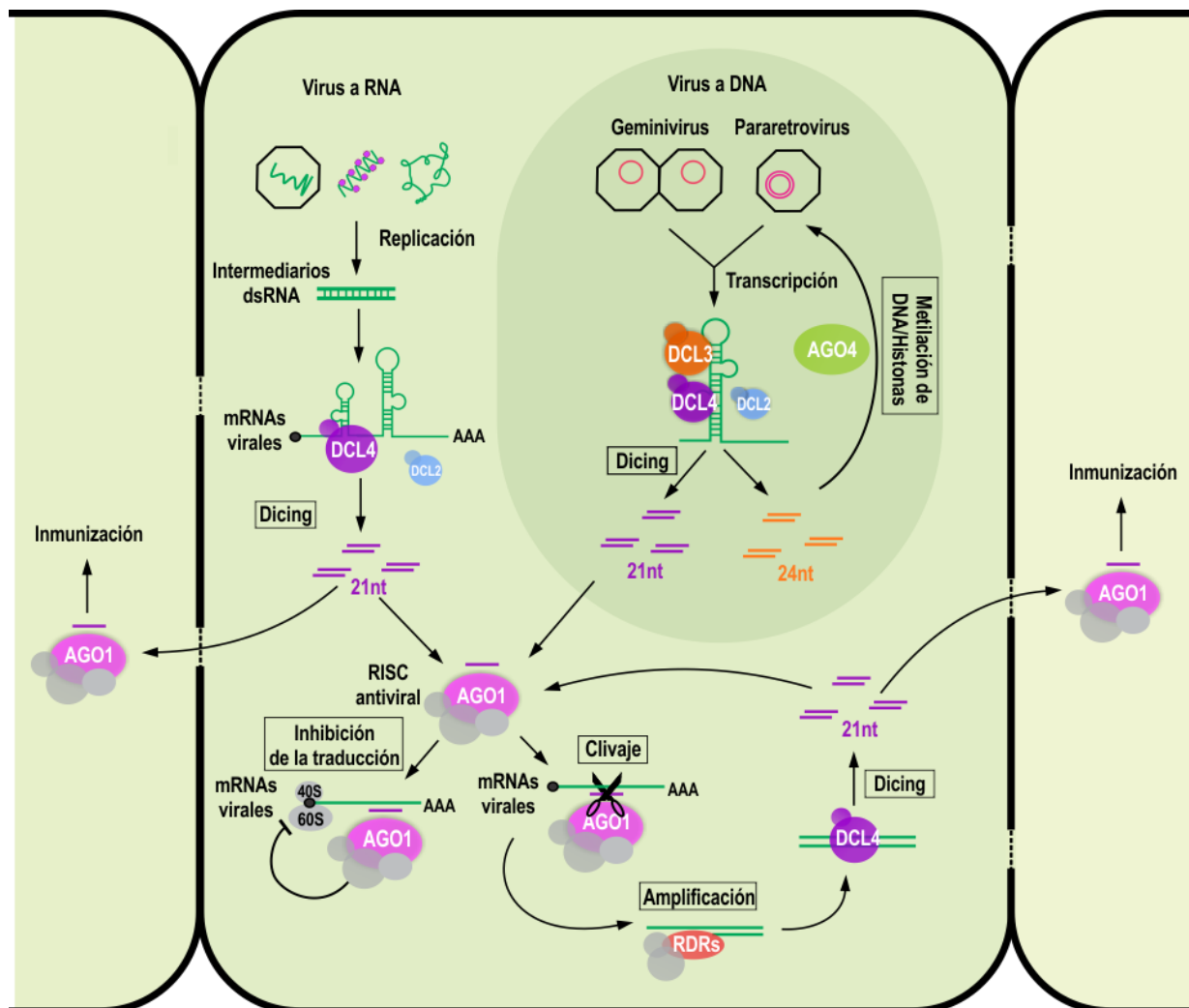


Figura 40. Esquema del mecanismo de silenciamiento antiviral de RNA en plantas. El silenciamiento antiviral de RNA es desencadenado por dsRNA intermediarios de replicación o por estructuras de plegado intermolecular dentro de los genomas virales que son procesadas por proteínas Dicer-like (DCL4, DCL3, y DCL2) en RNAs pequeños derivados del virus (vsRNAs). Estos vsRNAs son cargados en los complejos RISCs para guiar la inhibición de la traducción y/o el clivaje de RNA viral. Estos RNAs virales clivados son a su vez usados por RNA polimerasas RNA dependientes celulares (RDRs) para amplificar la señal de silenciamiento mediante la producción de más sustratos dsRNA para el procesamiento por DCLs. Estos vsRNAs pasan a las células vecinas por lo PDs diseminando la respuesta antiviral por todo el tejido. Tomado con modificaciones de Incarbone y Dunoyer, 2013.

3. Supresión del silenciamiento de RNA mediada por virus

Para escapar de la respuesta inmune establecida por el silenciamiento antiviral, los virus han desarrollado varios mecanismos de contra-defensa (Ding and Voinnet, 2007). Entre éstos, la producción de proteínas supresoras virales del silenciamiento de RNA (VSRs, *viral*

suppressors) es la estrategia viral más empleada (Wieczorek and Obrepalska-Stepłowska, 2015). Estas VSRs actúan en diferentes etapas (Incarbone and Dunoyer, 2013), algunas, como la proteína P19 de los tomosvirus, lo hacen uniendo y secuestrando dúplex de siRNA (*small interfering RNA*) para inhibir el ensamblaje de los complejos RISC y el movimiento célula a célula del silenciamiento de RNA (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2006; Dunoyer et al., 2010), mientras que otras inhiben el silenciamiento de RNA a través de la interacción con componentes de la maquinaria de silenciamiento de RNA (Burgan and Havela, 2011; Wu et al., 2010).

Información más detallada de los mecanismos de silenciamiento de RNA y de supresión del silenciamiento génico pueden leerse de Carbonell y Carrington, (2015); Csorba et al, (2015) y Zhang et al., (2015).

Además de su función supresora, muchas VSRs cumplen múltiples funciones en el ciclo viral. Por ejemplo, las VSRs P25 de PVX y HC-Pro de TuMV son también las proteínas de movimiento del virus.

4. Rol del nucléolo y otras estructuras sub-nucleares en la infección viral

Se sabe que tanto el nucléolo como otras estructuras subnucleares son cruciales para la función celular. Por lo tanto, es probable que la alteración de estas estructuras por interacción con los virus contribuya a la enfermedad celular, en particular a través de la alteración y/o el desplazamiento de proteínas presentes en estos compartimentos, entre otros.

4.1. El nucléolo

El nucléolo es una pequeña organela nuclear cuya función principal es la biogénesis de ribosomas, la biogénesis y el transporte de RNAs y RNPs, y la maduración de mRNAs, y está implicado en procesos como la senescencia, el control del ciclo celular y la respuesta al estrés (Carmo-Fonseca et al., 2000; Olson et al., 2002; Pederson, 1998; Rubbi and Milner, 2003). Además, el nucléolo desempeña un papel crucial en el ciclo de infección de varios virus a DNA y RNA (Greco, 2009; Hiscox, 2007; Taliansky et al., 2010). Dado que la mayoría de los virus a DNA se replican dentro del núcleo, es fácil comprender sus asociaciones con el nucléolo. Sin embargo, los virus a RNA se replican principalmente en el citoplasma de las células hospedantes, por lo que la lógica del paso por esta organela no es tan directa; pero sin duda, esta estrategia les ha permitido a estos virus adaptarse a sus hospedantes y lograr infecciones exitosas. Como resultado de sus genomas pequeños y limitada capacidad codificante, el reclutamiento de proteínas celulares con funciones definidas en el metabolismo del RNA sería

un paso necesario de los virus a RNA para facilitar la infección de su hospedante. Debido a que las proteínas nucleolares tienen muchas funciones cruciales en la biosíntesis, procesamiento y traducción del RNA celular, no sorprende entonces que las proteínas nucleolares se incorporen en los complejos de replicación y/o traducción de virus a RNA. Los virus a RNA interactúan con el nucléolo para usurpar las funciones de la célula hospedante y reclutar proteínas nucleolares que faciliten su replicación (Haupt et al., 2005b; Talianky and Robinson, 2003).

En las proteínas virales aún no se han identificado motivos conservados de direccionamiento a nucléolo (NoLSs), como ocurre con las NLS virales (Carmo-Fonseca et al., 2000). En general, los motivos proteicos implicados en el direccionamiento a nucléolo son ricos en residuos de arginina y lisina, sin embargo, no hay una secuencia o estructura consenso. En algunas proteínas virales, las NLSs y las NoLSs funcionan en conjunto para direccionar una proteína determinada al nucléolo (Rowland et al., 1999; Rowland et al., 2003). El hecho de que las proteínas virales contengan NoLSs es un fuerte indicio de que los virus han desarrollado funciones nucleolares específicas. Así mismo, las proteínas virales también pueden dirigirse al nucléolo a través de la asociación con proteínas celulares (Lee et al., 1998; Tsai and McKay, 2005).

Hay cada vez más evidencias que demuestran que la interrupción del tráfico nuclear o nucleolar de proteínas de virus a RNA de cadena positiva afecta la patogénesis viral (Peranen et al., 1990; Fazakerley et al., 2002; Lee et al., 2006). Por ejemplo, cuando se introducen mutaciones puntuales que suprimen la localización nuclear y nucleolar de la '*core protein*' de *Japanese encephalitis virus* (JEV), los virus recombinantes tienen alterada la replicación en comparación con el virus de tipo salvaje (Mori et al., 2005). Además, se han reportado diferentes proteínas de virus de plantas que se localizan en el nucléolo y están involucradas en el movimiento viral a larga distancia (Haupt et al., 2005; Ryabov et al., 1998; Tsai et al., 2005; Kim et al., 2007).

4.2. Los Cajal bodies

Además del nucléolo, el núcleo contiene otras estructuras o dominios diferentes (Lamond and Earnshaw, 1998; Shaw, 1996), de los cuales, los más estudiados son los cuerpos de Cajal (*Cajal bodies*, CBs) (Gall, 2000, 2003; Ogg and Lamond, 2002; Sleeman et al., 2001). Los CBs se encuentran en los núcleos tanto de animales como de plantas. En las plantas, están presentes en todas las especies y en todos los tipos celulares, y se encuentran frecuentemente asociados físicamente y funcionalmente con el nucléolo (Beven et al., 1995; Collier et al., 2006; Gall et al., 1995). Se ha encontrado que estas estructuras desempeñan papeles importantes en el metabolismo del RNA y en la formación de partículas de ribonucleoproteínas (RNP)

implicadas en la transcripción, el *splicing*, la biogénesis del ribosomas y el mantenimiento de telómeros. Por estudios de FRAP se ha demostrado que existe un flujo rápido de moléculas y complejos hacia y fuera de los CBs, por lo que se piensa que los CBs proporcionan una localización donde los componentes y los subcomplejos se puedan ensamblar antes de dirigirse al sitio donde actúan (Shaw and Brown, 2004). Se han observado cambios dinámicos en varias estructuras subnucleares durante las infecciones virales. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína ORF3, que es el factor de movimiento a larga distancia de Groundnut rosette virus (GRV), se acumula en el nucléolo y reorganiza los CBs (Ryabov et al., 2004).

Con el fin de comprender mejor el papel de los CBs en los ciclos de infección de virus de plantas, Shaw et al. (2014) realizó un *knock down* (KD) de coilina (proteína mayoritaria de los CBs) en plantas de *Nicotiana* y encontró que esta proteína podía modular diferencialmente las respuestas de la planta a una amplia gama de virus. Por ejemplo, demostró que la reducción de los CBs en respuesta al KD de coilina aumenta la acumulación de Barley stripe mosaic virus (BSMV; ssRNA, género *Hordeivirus*) y tomato golden mosaic virus (TGMV; DNA, género *Begomovirus*), con un incremento concomitante de la propagación sistémica del virus. Curiosamente, también se demostró que las deficiencias de coilina y CBs inciden en el *recovery* de los síntomas inducidos por Tomato black ring virus (TBRV; ssRNA, género *Nepovirus*) y Tobacco rattle virus (TRV; ssRNA, género *Tobravirus*) en las hojas emergentes. Este fenómeno de *recovery* se produce por mecanismos de silenciamiento que logran vencer la replicación y dispersión del virus en los tejidos nuevos. Sin embargo, en contraste con lo esperado, no se ha encontrado una reducción de los niveles de siRNAs (el principal sello del silenciamiento de RNAs) específicos de TRV y BSMV en plantas KD de coilina. Además, esto indica que el inicio del silenciamiento no está inhibido en plantas deficientes en coilina y que son capaces de desencadenar silenciamiento específico contra TRV o BSMV a niveles comparables con las plantas *wt*. Por lo tanto, se ha sugerido que tanto la coilina como los CBs podrían estar implicados en un mecanismo diferente de defensa del hospedante que funciona independientemente del silenciamiento de RNA (Shaw et al., 2014). En ese mismo estudio también se informó el fenómeno opuesto, en el que se descubrió que el KD de coilina reducía el desarrollo de síntomas y la acumulación de TVCV (ssRNA, género *Tobamovirus*) y Potato virus Y (PVY; ssRNA, género *Potyvirus*). En conjunto, estos datos sugieren que la coilina y los CBs son importantes en la regulación de la patogénesis de virus de plantas. Si bien los mecanismos implicados aún no se han descubierto, estas observaciones indican que podría haber interacción entre la actividad de la coilina (y los CB) y la defensa antiviral de las plantas. Como sabemos, el resultado de la enfermedad en una infección viral está dado por la competencia entre la defensa del huésped y la replicación y propagación del virus. La función

de la coilina y/o los CBs podría contribuir a ambos lados en esta competencia. Una posible actividad de la coilina puede ser interaccionar directamente con proteínas virales, como se demostró para las proteínas codificadas por Poa semilatifolia virus (PSLV, ssRNA, género *Hordeivirus*), que está estrechamente relacionado con BSMV (Semashko et al., 2012). En conjunto, estos datos sugieren que la coilina (CBs) tendría funciones que son explotadas por los virus de plantas para su propio beneficio y/o está involucrada en respuestas de defensa de las plantas frente a los virus.

El nucléolo y sus componentes pueden ser utilizados también por el sistema de defensa de la planta. Por ejemplo, una de las principales proteínas nucleolares, la nucleolina, se une a la región no codificante de TBSV (ssRNA, género *Tombusvirus*) (Jiang et al., 2010). Esta interacción conduce a una inhibición significativa de la replicación del RNA viral, lo que podría ser uno de los mecanismos que tienen las plantas de inmunidad innata (Talianky et al., 2010).

4.3. El nucléolo y los CBs en la supresión del silenciamiento de RNA

Varios informes recientes demuestran que los CBs también están involucrados en la modulación de la expresión de genes de plantas a través de la biogénesis de microRNAs (miRNA) y siRNA que, como se mencionó anteriormente, pueden desencadenar el silenciamiento génico transcripcional (TGS) y post-transcripcional, para controlar la expresión génica, afectando la producción o degradación de mRNAs (Mallory and Vaucheret, 2010; Pumplin and Voinnet, 2013).

Se ha demostrado en *Arabidopsis thaliana* que componentes de la maquinaria de silenciamiento, como AGO4 y DCL3, pueden co-localizarse en el núcleo con los CBs (Fujioka et al., 2007; Li et al., 2008; Li et al., 2006). Estos datos sugieren que en las plantas, los CBs pueden funcionar como centros de procesamiento que generan especies de RNA implicadas en el silenciamiento (Bassett, 2012). Además, se ha encontrado que en un mutante de *Arabidopsis* que tiene alterada la síntesis de coilina (proteína mayoritaria de los CBs) y por ende la producción de CBs, existe una reducción significativa de los niveles globales de proteína AGO4, lo que sugiere que los CB pueden desempeñar un papel en la estabilización de la proteína AGO4 (Li et al., 2008).

La proteína 2b codificada por CMV es el ejemplo más significativo de vínculo entre supresión del silenciamiento génico y localización nucleolar. Esta proteína fue una de las dos primeras VSRs reportadas en 1998 (Anandalakshmi et al., 1998; Beclin et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1998; Xin et al., 1998) y tiene varias propiedades únicas, como la localización en nucléolo y la interacciona tanto con proteína de la maquinaria de silenciamiento

de RNA (AGO1 y AGO4) como con dsRNAs cortos y largos (Gonzalez et al., 2010; Goto et al., 2007; Hamera et al., 2012; Zhang et al., 2006). Se ha demostrado que la interacción entre 2b y AGO1 es suficiente para inhibir la función *slicer* de AGO1 y que esta inhibición requiere de la localización nucleolar de 2b (Feng et al., 2013). Además, la proteína 2b interacciona en el nucléolo con la proteína nucleolar fibrilarina (Gonzalez et al., 2010).

Otro ejemplo de asociación entre supresión del silenciamiento génico y localización nucleolar lo constituye la proteína p23 de CMV, la cual tiene actividad supresora del silenciamiento de RNA y se localiza preferencialmente en nucléolo y CBs (Flores et al., 2013; Ruiz-Ruiz et al., 2013).

4.4. El nucléolo y los CBs en el transporte viral a larga distancia

Un virus de plantas que direcciona proteínas virales al nucléolo es GRV (ssRNA, género *Umbravirus*). La proteína ORF3 de GRV actúa como proteína de movimiento a larga distancia uniéndose al RNA viral para formar partículas filamentosas de RNP que protegen al RNA de la degradación (Ryabov et al., 1999a; Ryabov et al., 2001). Estas partículas se acumulan en el citosol y se desplazan a través del floema para diseminar el genoma viral en toda la planta. Además de la localización citoplasmática, también se ha encontrado en núcleos y preferentemente en nucléolos (Ryabov et al., 2004; Ryabov et al., 1998; Ryabov et al., 1999a; Ryabov et al., 2001; Taliansky et al., 2003).

Se cree que la localización nucleolar de la proteína ORF3 ocurre por la reorganización de CBs en múltiples estructuras de tipo CBs (*CB-like*, CBLs) que luego se fusionan con el nucléolo (Kim et al., 2007b). El ORF3 eventualmente migra desde el núcleo hasta el citoplasma, y durante este proceso secuestra fibrilarina del nucléolo y la deposita en el citosol, una localización donde no se encuentra normalmente (Kim et al., 2007a; Kim et al., 2007b; Lyon et al., 1997; Ogg and Lamond, 2002; Sleeman et al., 1998). También se demostró que la capacidad de la proteína ORF3 para mover el RNA viral a larga distancia a través del floema depende estrictamente de su interacción con fibrilarina. La proteína ORF3 entra en el nucléolo, donde forma complejos con fibrilarina que se relocalizan luego en el citoplasma. Allí, estos complejos interaccionan con el RNA viral para formar RNPs virales que son capaces de desplazarse a larga distancia (Canetta et al., 2008).

Otras MPs de virus de plantas que interaccionan con fibrilarina son las proteínas TGB1 del pomovirus PMTV y del hordeivirus PSLV (Makarov et al., 2016; Semashko et al., 2012). La proteína TGB1 codificada por el virus PMTV se localiza en el núcleo y nucléolo. La delección de 84 aminoácidos N-terminales elimina su localización nucleolar y el movimiento sistémico del virus, sin embargo, el virus mantiene la capacidad de moverse célula a célula (Lukhovitskaya et al., 2015). La proteína TGB1 de PSLV también puede interaccionar con fibrilarina tanto *in vitro*

como *in vivo* (Makarov et al., 2015). Por lo tanto, PMTV y PSLV representan más ejemplos de virus de plantas que requieren asociación con el nucléolo para controlar el movimiento a larga distancia de sus genomas.

4.5. Los dicing bodies (D-bodies)

Los *dicing bodies* (D-bodies) son estructuras subnucleares involucradas en el procesamiento de microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños de aproximadamente 21-22 nucleótidos que se encuentran en casi todos los eucariotas y son importantes para la regulación de la expresión génica (Chen, 2010; Lau et al., 2001; Llave et al., 2002; Molnar et al., 2007; Reinhart et al., 2000; Zhao et al., 2007). Al igual que los genes que codifican proteínas, los genes de los miRNA de plantas y animales son transcritos por la RNA polimerasa II en transcritos primarios, conocidos como pri-miRNAs. Un pri-miRNA contiene una estructura de tipo *stem-loop*: un dsRNA imperfecto tipo *hairpin* que alberga el miARN (Bartel, 2004; Chen, 2010; Kim and Nam, 2006; Laubinger et al., 2008; Lee et al., 2004; Xie et al., 2005). Los pri-miRNAs son luego procesados en dos eventos endonucleolíticos sitio específicos que los convierten en miRNA dúplex. En las células vegetales ambos pasos de corte se producen en el núcleo, mediante la acción de la enzima Dicer-like1 (DCL1) (Chen, 2005; Jones-Rhoades et al., 2006) y otras proteínas, incluyendo la proteína con dominio *zinc finger* Serrate (SE) (Lobb et al., 2006; Yang et al., 2006) y la proteína con dominio de unión a dsRNA Hyponastic Leaves1 (HYL1) (Han et al., 2004; Vazquez et al., 2004; Wu et al., 2007). Los miARNs de plantas son además metilados por Hua Enhancer (HEN1) en sus extremos 3' (Yu et al., 2005) y cargado en Argonaute 1 (AGO1) (Baumberger and Baulcombe, 2005).

Por microscopía de fluorescencia *in vivo* se encontró que DCL1 se acumula preferencialmente en cuerpos nucleares redondos, excluidos del nucléolo (Fang and Spector, 2007) y que la proteína HYL1 muestra un patrón de localización similar a DCL1. Por análisis de co-localización se observó que los cuerpos de DCL1 y los cuerpos de HYL1 son las mismas estructuras (Fang and Spector, 2007; Song et al., 2007), las cuales son actualmente conocidas como D-bodies. En este escenario, los pri-miRNAs podrían ser reclutados a los D-bodies, donde serían procesados por DCL1 y HYL1 (Fang and Spector, 2007). Se ha observado también que AGO1 exhibe localización en D-bodies además de su distribución en nucleoplasma y citoplasma (Fang and Spector, 2007). Los D-bodies son diferentes a la mayoría de los cuerpos nucleares conocidos, debido a su forma redonda, tamaño y número promedio por núcleo (Shaw and Brown, 2004), pero similares a los CBs (Nizami et al., 2010). El número de D-bodies presente en cada núcleo varía entre 0 y 4 (Fang and Spector, 2007).

HIPÓTESIS

- La proteína 24K se localiza en compartimientos subnucleares específicos.
- La proteína 24K se localiza en microtúbulos.
- La proteína 24K contiene dominios proteicos responsables de su localización subcelular
- La localización de la proteína 24K en los compartimientos subnucleares es fundamental para su función como proteína supresora del silenciamiento génico.
- La localización de la proteína 24K en el nucléolo, estructuras subnucleares y filamentos en citoplasma está relacionada con una posible participación en el mecanismo de movimiento viral a larga distancia.

OBJETIVOS

Sabemos que la proteína 24K de CPsV se localizan en nucléolo y en agregados en nucleoplasma, que presenta la capacidad de unir dsRNA largos (Robles Luna et al., 2017b), y que posee función supresora del silenciamiento génico. Por lo tanto, para comprender el mecanismo de acción de esta proteína en el ciclo infectivo de CPsV, sería de sumo interés encontrar una asociación nucléolo-supresión y/o nucléolo-movimiento, como se ha reportado para otras proteínas virales.

Para determinar estos interrogantes se plantearon los siguientes objetivos:

1. Avanzar en la determinación de las localizaciones subcelulares de la proteína 24K.
2. Predecir por análisis bioinformático la presencia de posibles señales de direccionamiento subcelular y motivos o dominios funcionales de la proteína 24K de CPsV.
3. Generar una batería de mutantes de la proteína 24K que tengan alterados posibles dominios funcionales.
4. Analizar la importancia de estos dominios en la localización subcelular de la proteína 24K
5. Vincular las localizaciones subcelulares observadas con las posibles funciones de la proteína 24K en el ciclo viral

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de la proteína 24K de CPsV

Como primer enfoque para tratar de determinar los posibles dominios de la proteína 24K responsables de su actividad, se realizó un estudio bioinformático de la secuencia aminoacídica de la misma utilizando distintos servidores *on-line*.

1.1. Predicción bioinformática de posibles señales de localización subcelular presentes en la secuencia de la proteína 24K

Como se mencionó en la introducción, la proteína 24K de CPsV se ha encontrado acumulada en agregados en nucleoplasma en células epiteliales de *N. benthamiana*. Una forma de dirigirse a tales compartimientos sería portando las señales de localización específicas para cada uno de éstos. Así, se realizó una búsqueda de posibles NLS, sin embargo, los software ScanProsite (de Castro et al., 2006) y WoLF PSORT (Horton et al., 2007) no predijeron ninguna NLS.

Como se mencionó en el capítulo 2, las reglas y señales que rigen la localización y la exportación nuclear de proteínas celulares están bien definidas. Por el contrario, las señales que gobiernan la localización y retención nucleolar no son claras (Carmo-Fonseca et al., 2000). Los motivos implicados son en general ricos en residuos de arginina y lisina, sin embargo, no hay secuencia o estructura de consenso inmediatamente obvia. Posiblemente, las proteínas que se localizan en el nucléolo también pueden tener motivos de importación nuclear y, si es necesario, exportación nuclear. Las NoLSs (señales de localización nucleolar) que se han identificado hasta el momento pueden agruparse en aquellas que contienen motivos únicos y aquellas que contienen motivos múltiples (Kubota et al., 1999). Alternativamente, las señales pueden tomar la forma de una interacción entre varios dominios funcionales de una proteína (Sheng et al., 2004). La localización en nucléolo también puede ser regulada por unión a pequeñas moléculas efectoras (Tsai and McKay, 2005). En muchos casos, las proteínas que se localizan en citoplasma y en núcleo y/o nucléolo contienen múltiples señales que determinan su localización subcelular (Cros et al., 2005; Ladd and Cooper, 2004; Ryabov et al., 2004; Tsukahara and Maru, 2004). Esta situación dificulta la identificación de NoLSs, ya que muchas proteínas que se localizan en el nucléolo también se localizan en el núcleo y contienen tanto NLSs clásicas como NoLSs, cuyas secuencias pueden superponerse. De este modo, la localización nucleolar de una proteína puede estar gobernada por varios factores, incluyendo si

la proteína se asocia con otra proteína del nucléolo, o si se dirige al nucléolo por sí sola o en asociación con transcriptos de RNA que se están transcribiendo en el nucléolo. Claramente, las combinaciones de estas posibilidades podrían ocurrir, lo que dificulta las predicciones de las NoLS. Cuando se analizó la secuencia de la proteína 24K con el software NOD (Scott et al., 2010; Scott et al., 2011) no se encontraron regiones de secuencia con motivos NoLSs putativos. Sin embargo, el mismo servidor predice una NoLS putativa en la proteína homóloga 25K de MiLBVV cuya secuencia es ₃₅TVISKGKNEEKSLMK₄₉ (Robles Luna, 2014). Esto indica que no debería descartarse que la proteína 24K contenga una región de secuencia similar con función NoLS que no es detectada por los servidores disponibles.

Como la proteína 24K también se encuentra localizada en citoplasma, y con el objetivo de determinar si la proteína es translocada del núcleo al citoplasma por una NES presente en su secuencia, se realizó una predicción bioinformática en búsqueda de NES putativas con los *softwares* LocNES (Xu et al., 2015), NetNES (la Cour et al., 2004) y ValidNES (Fu et al., 2013), obteniéndose los siguientes resultados:

- LocNES: predicción de la región 148-EQEITEELLKCLKII-162 con alta probabilidad de funcionar como NES (score=0.509).

LocNES también predice una posible NES en la secuencia de la proteína 23K de BIMaV entre los aminoácidos 152-TKYTELKRSIRKLVI-166 con un score=0.294.

- NetNES: predicción de una NES putativa en la región 156-LKKLKIIIS-164 (Figura 41).

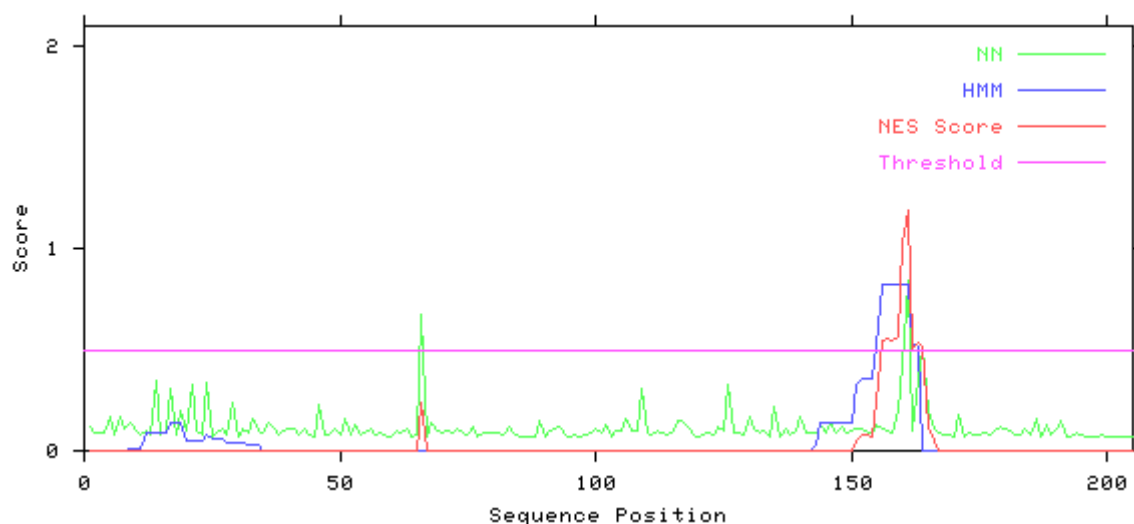


Figura 41. Gráfico de los valores predichos (*score*) por el servidor NetNES para cada posición. El servidor calcula el 'NES score' para cada residuo a partir de los *score* predichos por HMM (*Hidden Markov Model*) y ANN (*Artificial Neural Network*). Se muestran los tres valores para cada posición. Si el 'NES score' sobrepasa el umbral, entonces se espera que esa posición participe en una señal de exportación nuclear. Cabe aclarar que las ANN están entrenadas para reconocer específicamente la última posición hidrofóbica del motivo (la más C-terminal).

Este servidor también predice una NES en la región 157-LKRSIRKLVI-166 de la proteína 23K de BIMaV.

- ValidNES: Predice la región 156-LKKLKI-161 con un 72% de probabilidad de funcionar como NES

En la Figura 42 se muestra un esquema de la proteína 24K y un alineamiento entre las proteínas 22K, 23K, 24K y 25K de la región alrededor de la NES putativa predicha para 24K y 23K.

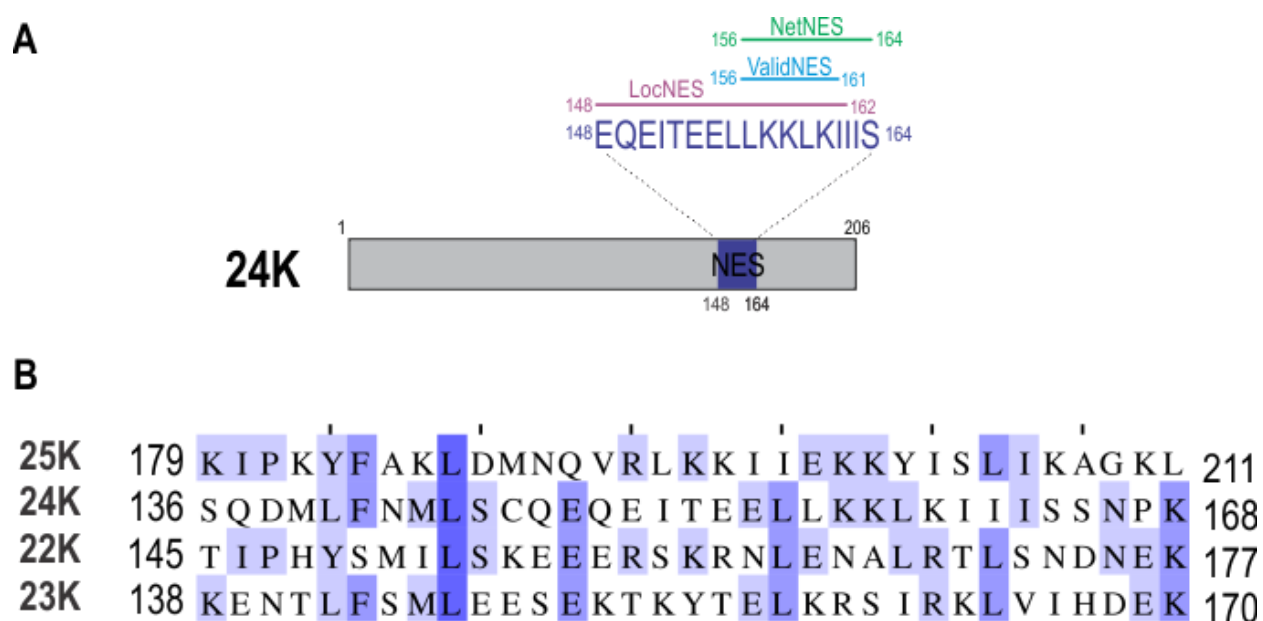


Figura 42. A) Esquema de la proteína 24K de CPsV. Se marca en azul la región y secuencia entre los aminoácidos 148 y 164. Se señalan las regiones predichas por LocNES en violeta, ValidNES en celeste y NetNES en verde. B) Alineamiento de las secuencias de las proteínas 25K (MiLBVV), 24K (CPsV), 22K (LRNV) y 23K (BIMaV) en la región alrededor de las NES predichas para 24K y 23K.

1.2. Predicción de posibles regiones de unión a ácidos nucleicos

Al igual que ocurre con la MP^{CPsV}, la proteína 24K presenta la capacidad de unir dsRNAs *in vitro* (Robles Luna et al., 2017b), por lo que resulta de interés lograr determinar posibles regiones de interacción con ácidos nucleicos. Para esto, se hizo una predicción de motivos de unión a RNA utilizando los software BindN (Wang and Brown, 2006) y Pprint (Kumar et al., 2008). Además se realizó un análisis con Pprint de las secuencias de la proteína 22K de LRNV, 23K de BIMaV y 25K de MiLBVV. En la Figura 43 se muestra un alineamiento de las secuencias de estas cuatro proteínas, donde se resaltaron en rojo los residuos de unión a RNA predichos por Pprint para cada proteína. Se destacan en negrita los residuos cuya probabilidad

Conservation:			9						5					5	9				
25 kDa MiLBVV	1	MSQFKDKSILKSNEVPEEMFTCISG	STDTNGEMKT	VISKGNKEEKSLMKT	TKNKVNRI	RFLFLNYHVKELPI												70	
24 kDa CPsV	1	MAE-----YIEV-		EVE-		LHWG-----												16	
22 kDa LRNV	1	MD-----LLENATQG	TESNCEQGV	L-----NL	LKASGHI-----L	TEYTL												36	
23 kDa BlMaV	1	M-----QVC-	DRNRKDRSF	KRYKLSSKE-----L	NINIKI													29	
Consensus_ss:			hhhhh		hhh		hhhhh	e									eeeeee		
Conservation:			5	5	5	555	5	5		5	5	9	9	5		5	5	595	95
25 kDa MiLBVV	71	MDHSIAERNSEMMKTV	MRKYTSY-RE----	VTRFLIGSWLLFAE-----	KLI-PPFNMKAI	IIETDO													127
24 kDa CPsV	17	----LELNTEQIE	LSKKLNIVNEDC	IMKTS--IIGMWIFMPD	VQESIADS-PLVT	TKAWIIP-HE	S												78
22 kDa LRNV	37	HEKKVVERNSHE	YQKLMKYKTSY-TE-	EGRFLFGSWLLTSD-----	KVP-RIFDKKAVI	IITLN													93
23 kDa BlMaV	30	N-----DKLFETE	EKFMYNHGIEGE-----	TKRCLFGLWMFESS-----	NCNSYIFRK	GVI	FLSKEH												83
Consensus_ss:		hhhhhhhh	hhhhhhhhhh	hh		hhhhhhhhhhhhhh												eeeeeeee	
Conservation:			5	9	5				9					5				55	9
25 kDa MiLBVV	128	KLVDVADFEGIEILL	GNNIQSCLD-SFY	MRFYKEDLILYNTANE	LLLLID-----NF--	KIPKYAKLD													188
24 kDa CPsV	79	PYKTLYGDGIQMAV	QNEEDLFKDPEFF	FMISCD--SVMLTKN	NKTIIINKELMNCDI--	SQDMLFNMLS													145
22 kDa LRNV	94	SFVDVVLYYDDIF	ISLTQKICDIFT-SL	FFQLYKVDA	MFSGDKKIYRLN-----GY--	TIPHYSMILS													154
23 kDa BlMaV	84	DVHMTSYFDDEIE	ICICNEKFELLS-EDSYNN	LTDGMIFKVPNHN	LYELYA-----HDDKKKENT	LFSMLE													147
Consensus_ss:		hhhhhhh	eeeeee	hhhhh	hhhhhhhh	eeeeee	eeeeee											hhhhhhhhh	
Conservation:			5		5		5		5										
25 kDa MiLBVV	189	MNQVR	LKKIIEKKYISLIKAGKL-----																211
24 kDa CPsV	146	CQEQEITEELLK	LKKIISSNPKLENKIDEVF	WNSTRILNWQHND	GGGNSGVSFR---														206
22 kDa LRNV	155	KEEERSKRNL	ENALRTLSNDNEK-----KC	DSTCSLSVS---TMKH	F-----														193
23 kDa BlMaV	148	ESEKTYTEL	KRSIRKLVIHDEK-----RK	FFS---AQSSF-KDAE--TSS	GIRDPVE														194
Consensus_ss:		hhhhhhhhhh	hhhhhhhhhh	hh		h		h	hhh	hhh									

Figura 43. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas 25K (MiLBVV), 24K (CPsV), 22K (LRNV) y 23K (BIMaV). Los residuos de unión a RNA predichos por Pprint se marcan en rojo, en negrita los residuos de unión conservados, y en verde los predichos por FastRNABindR para la 24K.

Para analizar la ubicación de estos posibles residuos de unión a RNA en la estructura tridimensional de 24K, se realizó una predicción de estructura tridimensional con los *softwares* I-TASSER (Yang et al., 2015) y MUSTER (Wu and Zhang, 2008). La calidad de los modelos propuestos por ambos programas se analizó con Verify_3D (Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992; Wu and Zhang, 2008) y ProSA (Wiederstein and Sippl, 2007). En base a estos resultados se eligió uno de los modelos propuestos por I-TASSER, el cual posee un C-score=-4.46. Uno de los *templates* a destacar utilizados por I-TASSER para realizar el modelado, es la estructura de una proteína de *S. cerevisiae* implicada en la importación nuclear (PDB: 3EA5). En la Figura 44 se muestra el modelado donde se resaltan en azul los cuatro residuos de unión a RNA que se conservan en las tres proteínas homólogas de 24K.

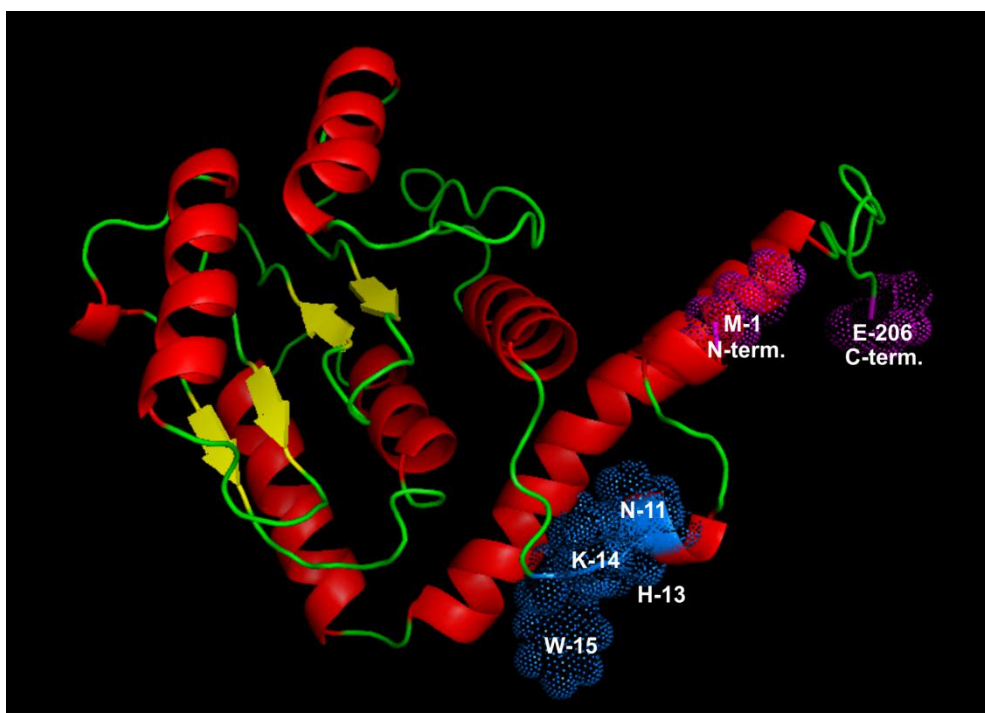


Figura 44. Modelado estructural de 24K realizado con el servidor I-TASSER. Se marcan en azul los residuos de unión a RNA conservados. En magenta se marcan los extremos N-terminal (M-1) y C-terminal (E-206) de la secuencia.

1.3. Predicción de motivos WG/GW

Uno de los mecanismos por los cuales las proteínas supresoras virales actúan es mediante interacción con las proteínas AGO, y posterior inhibición de la actividad *slicer*, como ocurre con la proteína 2b de CMV. Las proteínas AGO interaccionan con proteínas que se caracterizan por la presencia de motivos secuenciales repetidos que contienen dos aminoácidos: glicina (G) y triptófano (W), conocidos como motivos WG/GW (El-Shami et al., 2007). Las secuencias de estos dominios son extremadamente divergentes, pero a pesar de la baja similitud de secuencia, los dominios revelan una composición común de aminoácidos, siendo ricos en glicina, serina y triptófano, con bajos niveles de cisteína, fenilalanina, histidina, metionina y tirosina (Karlowski et al., 2010). Esta falta de similitud de secuencia no influye en la universalidad funcional del dominio (El-Shami et al., 2007). Los motivos WG/GW median la interacción directa con varios miembros de la familia de proteínas AGO en todo el reino eucariótico (Bednenko et al., 2009; Ding et al., 2005; Eulalio et al., 2009; He et al., 2009; Jakymiw et al., 2005; Karlowski et al., 2010; Partridge et al., 2007; Till et al., 2007), por lo que son estrictamente necesarios para el mecanismo de silenciamiento de RNA.

Se ha demostrado que los virus codifican proteínas que albergan motivos WG/GW funcionales, lo que conduce a la supresión de los mecanismos de silenciamiento del hospedante (Aqil et al.,

2013; Azevedo et al., 2010; Bivalkar-Mehla et al., 2011; de Ronde et al., 2014; Giner et al., 2010; Szabo et al., 2012).

La secuencia extremadamente divergente, las longitudes de aminoácidos variables (que van desde 22 hasta 650 aa) y el número irregular de repeticiones dipeptídicas WG/GW que lo componen (de 1 a 40) hacen que el dominio WG/GW sea muy difícil de identificar usando métodos *in silico* (Karlowski et al., 2010). La falta de conservación de la secuencia también impone propiedades estructurales indeterminadas. Por lo tanto, es posible que además de los residuos de triptófano y glicina conservados en el dominio WG/GW, otros componentes sean responsables de la creación del entorno de unión (Karlowski et al., 2010).

Con el fin de determinar una posible interacción entre la proteína 24K y las proteínas AGO, se realizó una predicción de motivos WG/GW en la proteína 24K con el servidor AGOS (Zielezinski and Karlowski, 2011), encontrándose un posible dominio entre las posiciones 11 y 18 (11-NLHKWGLE-18) con muy baja compatibilidad de composición. En la Figura 44 se puede ver la ubicación del W15 presente en este motivo. Este servidor no detecta la presencia de motivos similares en las proteínas homólogas de ninguno de los otros ophiovirus secuenciados, es decir, la proteína 25K de MiLBVV, 23K de BIMaV, y 22K de LRNV.

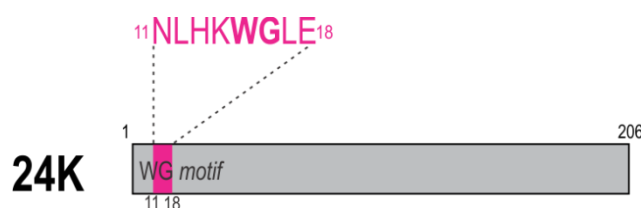


Figura 45. Esquema de la proteína 24K de CPsV. Se marca en magenta la región y secuencia del motivo WG predicho por el servidor AGOS.

2. Diseño y generación de mutantes de la proteína 24K de CPsV

Con el fin de determinar posibles dominios y/o motivos funcionales de la proteína 24K, se generaron cuatro mutantes donde se alteraron distintas regiones en base al análisis bioinformático del punto 1 (Figura 46).

- Mutante 24 Δ N: donde se eliminaron los primeros 33 aminoácidos del extremo N-terminal. Esta región podría estar involucrada en el direccionamiento subcelular de la proteína. Además contiene el motivo WG predicho por el servidor AGOS.
- Mutante 24 Δ C: se eliminaron los últimos 17 aminoácidos C-terminales. Esta región tiene residuos con muy altas probabilidades de unir RNA

- Mutante 24 Δ NES: se eliminaron los aminoácidos 156 a 170 (156-LKKLKIISSNPKER-170). Esta región podría ser parte de una señal de exportación nuclear.
- Mutante 24W15A: Se realizó la sustitución por Alanina del Triptófano 15 que es parte del motivo WG presente en la secuencia. De esta forma, se alteró de manera puntual el posible dominio de unión a AGO

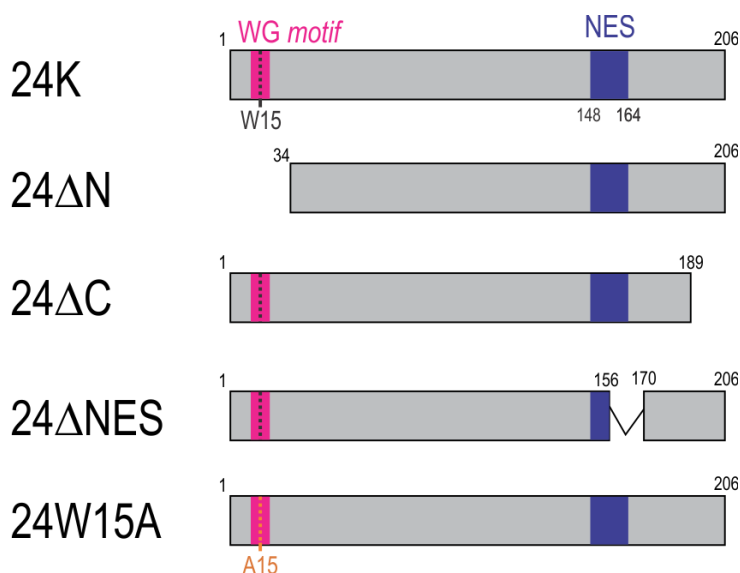


Figura 46. Esquemas de los mutantes de la proteína 24K generados.

Al igual que los mutantes de la MP^{CPsV}, estos mutantes se generaron utilizando la estrategia de *overlapping* PCR (ver Materiales y Métodos).

3. Análisis funcional de la proteína 24K y sus versiones mutadas

Para el análisis funcional de los mutantes de la proteína 24K de CPsV, se generaron fusiones traduccionales de los mismos a las proteínas fluorescentes eGFP y mRFP (ver Materiales y Métodos). Una vez obtenidas las diferentes proteínas de fusión, se analizó su comportamiento en ensayos de expresión transitoria en células epiteliales de *N. benthamiana*.

3.1. Análisis de la expresión de los mutantes de 24K

Se analizó el nivel de expresión y la integridad de las proteínas de fusión obtenidas mediante *western blot* (Figura 47). Los cuatro mutantes se expresaron en niveles detectables y se observó la presencia de una única banda específica en todos los casos.

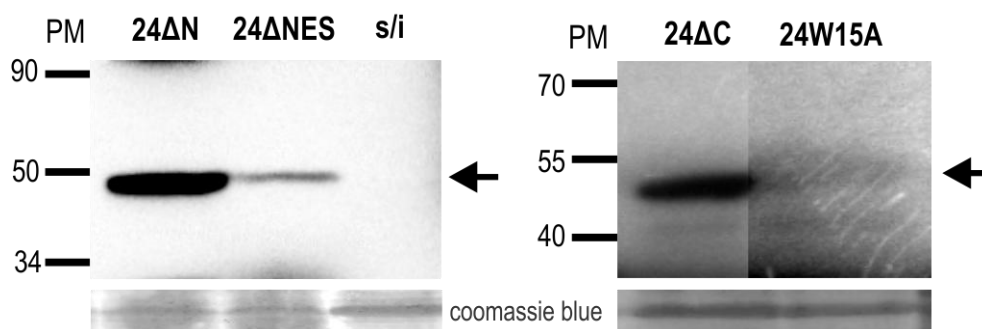


Figura 47. Análisis por *western-blot* de extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* expresando la proteína 24K *wt* o cada uno de los mutantes indicados a 4 dpi. Se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-GFP. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda (kDa). Como control de carga se usó tinción con *coomassie blue*. *s/i*=extracto proteico de hojas no agroinfiltradas.

3.2. Estudio de la localización subcelular de la proteína 24K y sus mutantes

Se analizó la localización subcelular de la proteína 24K y los mutantes fusionados en su extremo C-terminal a eGFP por microscopía confocal. Se realizaron expresiones transitorias en hojas de *N. benthamiana* de los mutantes en conjuntos con marcadores de diferentes compartimientos celulares.

3.2.1. Localización subcelular de la proteína 24K

Se analizó la localización subcelular de la proteína 24K:eGFP mediante co-expresiones con distintos marcadores subcelulares: fibrilarina fusionada a la proteína RFP (Fib:RFP) (Barneche et al., 2000; Kim et al., 2007a) como marcador de nucléolo y CBs; U2B^{''}:RFP (U2 *small nuclear ribonucleoprotein* B^{''} fusionada a RFP) específico de CBs, y mRFP libre, como marcador de nucleoplasma (Figura 48).

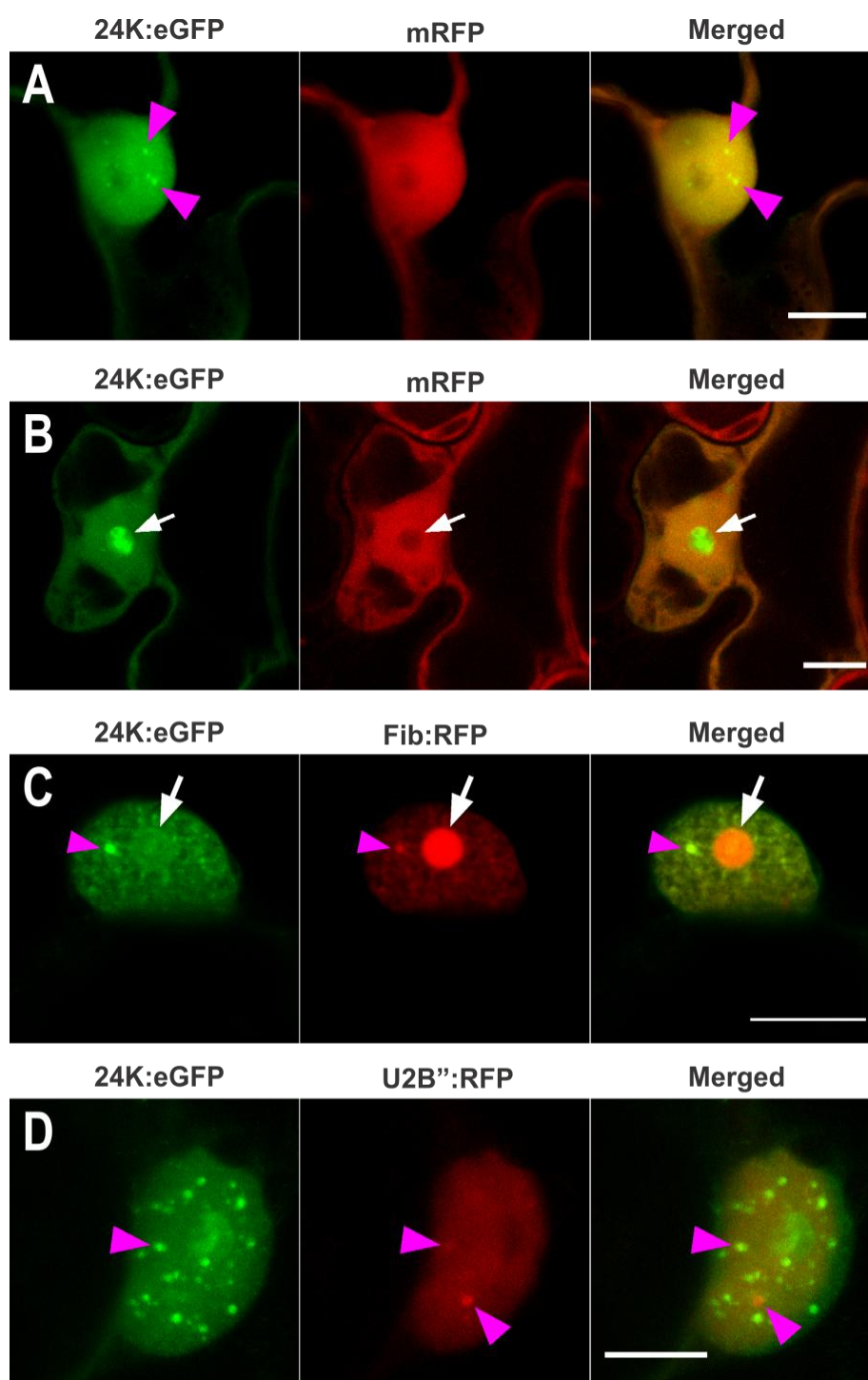


Figura 48. Localización subcelular de 24K:eGFP. Co-expresión de 24K:eGFP con mRFP (A) y (B), Fib:RFP (C), y U2B'':RFP (D). Imágenes tomadas a distintos tiempos posteriores a la agroinfiltración. Las flechas blancas marcan los nucléolos y las puntas de flecha color magenta los agregados en nucleoplasma. Escala=10µm

Cuando se analiza la expresión de la proteína de fusión 24K:eGFP se observa que a partir de los 2 a 3 dpai comienzan a aparecer pequeños agregados en el nucleoplasma y a ocuparse los nucléolos (Figura 48, panel A). Luego de 4 dpai los nucléolos aparecen marcados por completo con 24K:eGFP (Figura 48, panel B). Para determinar si los agregados en nucleoplasma se

tratan de CBs, se realizaron co-expresiones con el marcador de CBs U2B⁺:RFP y Fib:mRFP (Figura 48, panel C y D). Se puede observar que sólo algunos agregados de 24K:eGFP co-localizan con los marcadores de CBs, lo que indica que además de localizarse en CBs, la proteína 24K forma parte de otros agregados o estructuras subnucleares. Estas subestructuras podrían tratarse de *D-bodies*, que como se mencionó en la introducción, son estructuras donde los precursores de miRNAs son procesados por DCL1 y otras proteínas (Fang and Spector, 2007; Fujioka et al., 2007; Song et al., 2007).

Robles Luna en su Tesis Doctoral (2014), observó que la proteína 24K formaba filamentos citoplasmáticos en región cortical de las células. Con el fin de determinar la naturaleza de estos filamentos, se realizaron co-expresiones de 24K:eGFP con el marcador de microtúbulos TUA2:mRFP (Van Damme et al., 2004), como se muestra en la Figura 49, panel A.

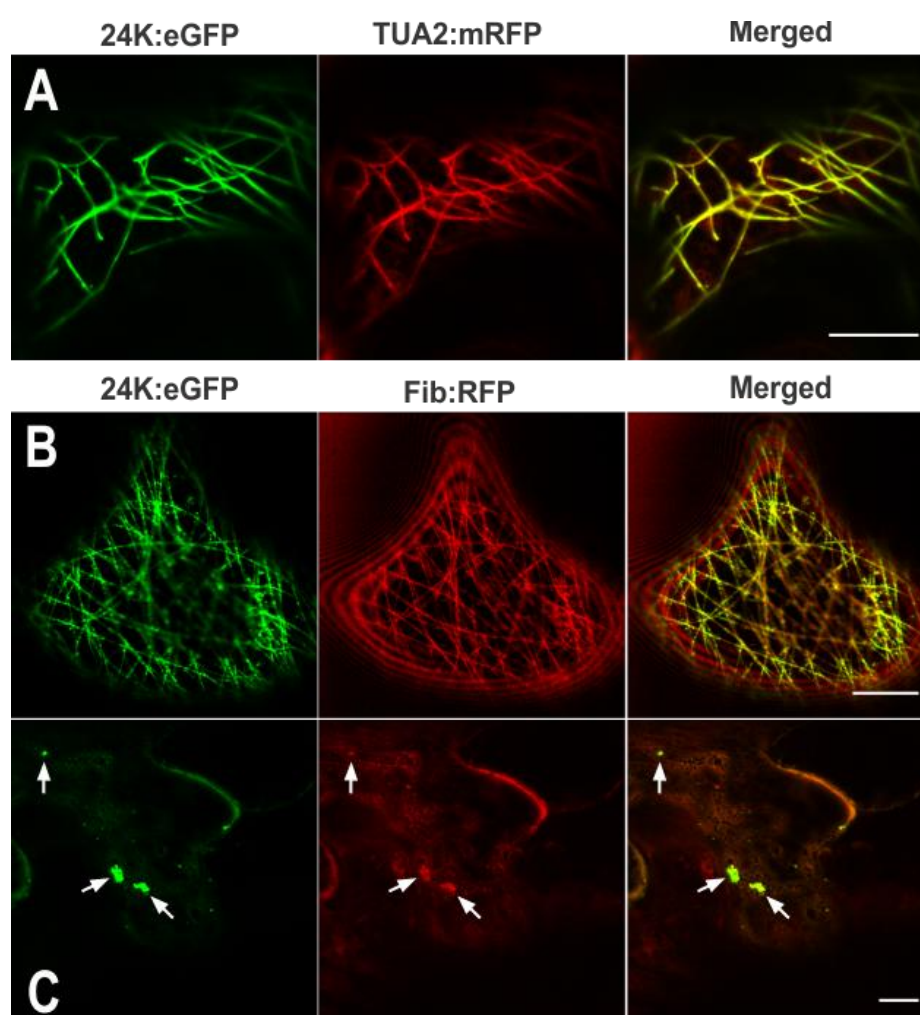


Figura 49. Localización de 24K:eGFP en microtúbulos y agregados citoplasmáticos. Co-localización de 24K:eGFP con el marcador de microtúbulos TUA2:mRFP (A) y con Fib:rFP (B y C). Las flechas indican los agregados citoplasmáticos de 24K con fibrilarina. Escala=10μm.

Se encontró que ambas proteínas co-localizan, por lo que se confirmó la asociación de la proteína 24K con los MTs.

También se analizó la asociación de 24K con fibrilarina en otras regiones de la célula, ya que de estar interaccionando, la proteína 24K podría relocalizar a fibrilarina (que en condiciones normales se localiza únicamente en nucléolo) a otras partes de la célula. Se encontró co-localización de 24K:eGFP con Fib:RFP en MTs (Figura 49, panel B) y en agregados citoplasmáticos (Figura 49, panel C). Estos agregados citoplasmáticos son similares a los encontrados entre fibrilarina y la proteína ORF3 de CMV (Ryabov et al., 2001; Ryabov et al., 1999b), por lo que estos resultados sugieren una posible asociación entre la proteína 24K y el mecanismo de transporte viral de CPsV.

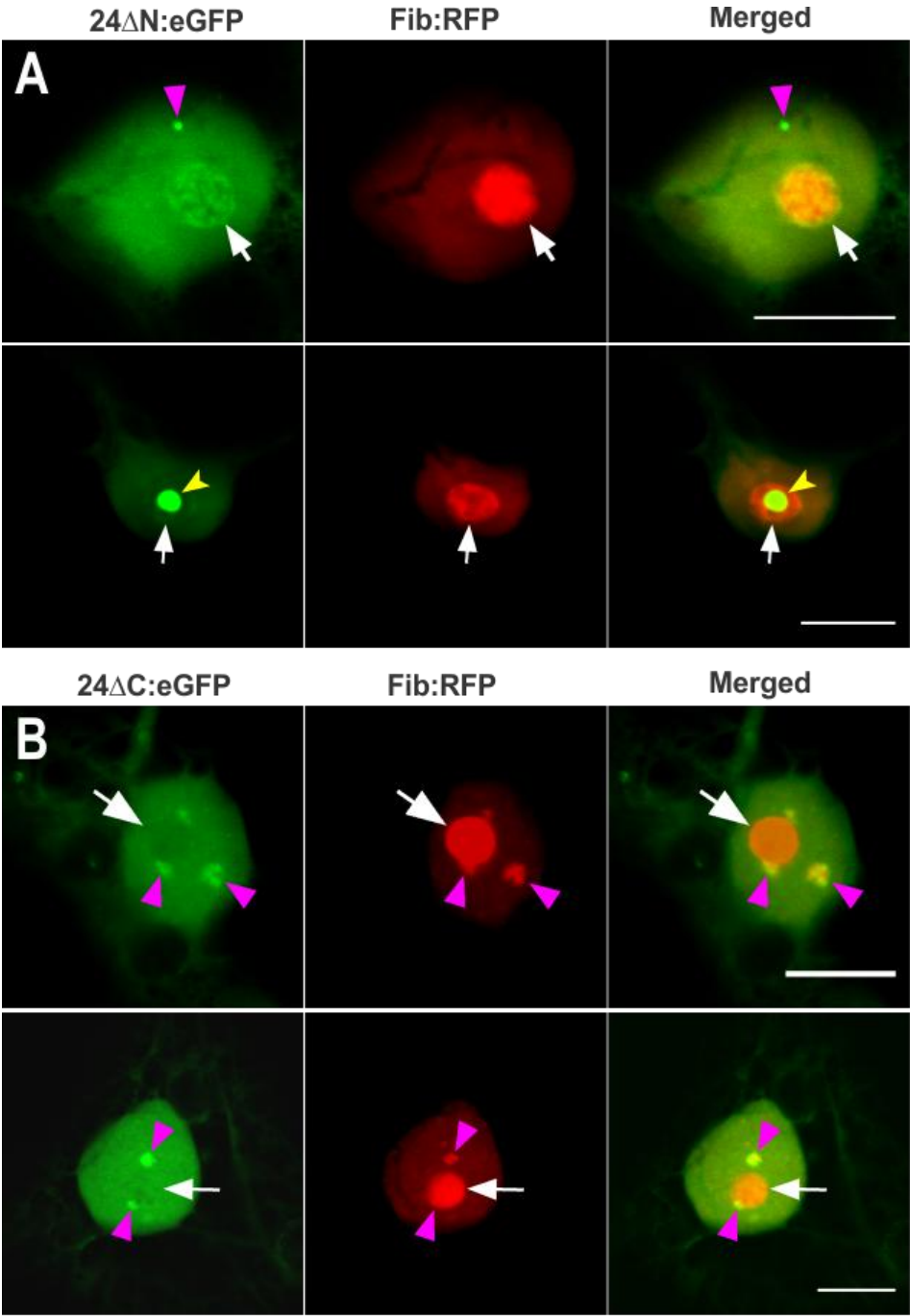
3.2.2. Localización en nucléolo y nucleoplasma de los mutantes de 24K

Se analizó el efecto de las mutaciones introducidas en la proteína 24K en la capacidad de localización en nucléolo y agregados en nucleoplasma. Para esto, se co-expresaron por agroinfiltración cada una de las versiones mutadas de la proteína 24K fusionadas a eGFP con el marcador de nucléolo y CBs, Fib:RFP. En la Figura 50 podemos observar que el mutante 24 Δ N:eGFP es capaz de co-localizar con Fib:RFP en nucléolo, aunque la distribución no es la misma que la proteína sin mutar. Además, si bien forma agregados en nucleoplasma, éstos no parecen tratarse de CBs ya que no se observa co-localización con agregados de Fib:RFP en nucleoplasma, y el número de agregados es mucho menor comparado con los formados durante la expresión de la proteína wt (Figura 50, panel A).

El mutante 24 Δ C:eGFP co-localiza con Fib:RFP tanto en nucléolo como en nucleoplasma, pero la distribución de la proteína parece ser menor en el nucléolo en comparación con la proteína wt, por lo que es probable que se haya afectado su capacidad de acumulación en este compartimiento. Debido a que todos los agregados de 24 Δ C:eGFP observados en nucleoplasma co-localizan con Fib:RFP, podrían tratarse de CBs (Figura 50, panel B).

El mutante 24 Δ NES:eGFP, co-localiza con Fib:RFP en CBs y nucléolo, sin embargo, la localización en nucléolo es mayoritariamente en forma de agregados, encontrándose muy pocos nucléolos completamente marcados (Figura 50, panel C).

El mutante 24W15A:eGFP se acumula marcadamente en el nucléolo, y en agregados en nucleoplasma que co-localizan con fibrilarina (Figura 50, panel D).



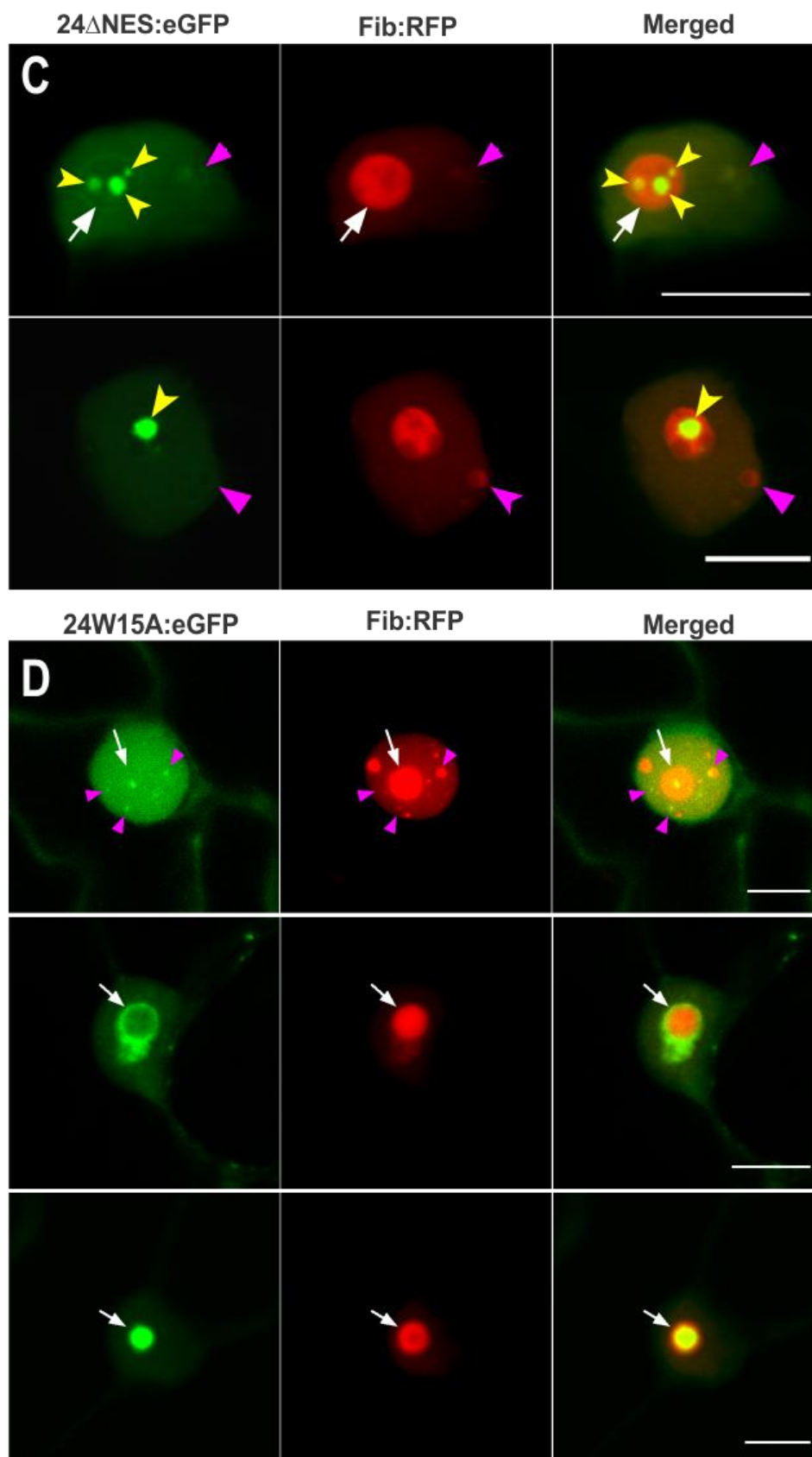


Figura 50. Localización subcelular de los mutantes de 24K. Co-expresión de Fib.RFP con los mutantes: (A) 24 Δ N:eGFP, (B) 24 Δ C:eGFP, (C) 24 Δ NES:eGFP, y (D) 24W15A:eGFP. Las flechas blancas marcan los nucléolos, las puntas de flecha color magenta los agregados en nucleoplasma y las puntas color amarillo agregados en nucléolo. Escala=10 μ m

3.2.3. Localización en microtúbulos y agregados en citoplasma

Sabiendo que la proteína 24K:eGFP co-localiza con Fib:RFP en MTs y en agregados en citoplasma, el siguiente paso fue analizar si las mutaciones introducidas en la proteína 24K afectan estas asociaciones. Para esto, se realizaron co-expresiones de los mutantes de 24K fusionados a eGFP con Fib:RFP, en busca de filamentos corticales y agregados citoplasmáticos marcados con ambas proteínas (Figura 51). Se encontró que el mutante 24 Δ N mantiene la localización en agregados con fibrilarina en citoplasma, similares a los de la proteína wt. El mutante 24W15 presenta mayor cantidad de agregados en comparación con la proteína 24K. Se encontró también que el mutante 24 Δ NES mantiene la asociación con fibrilarina en microtúbulos.

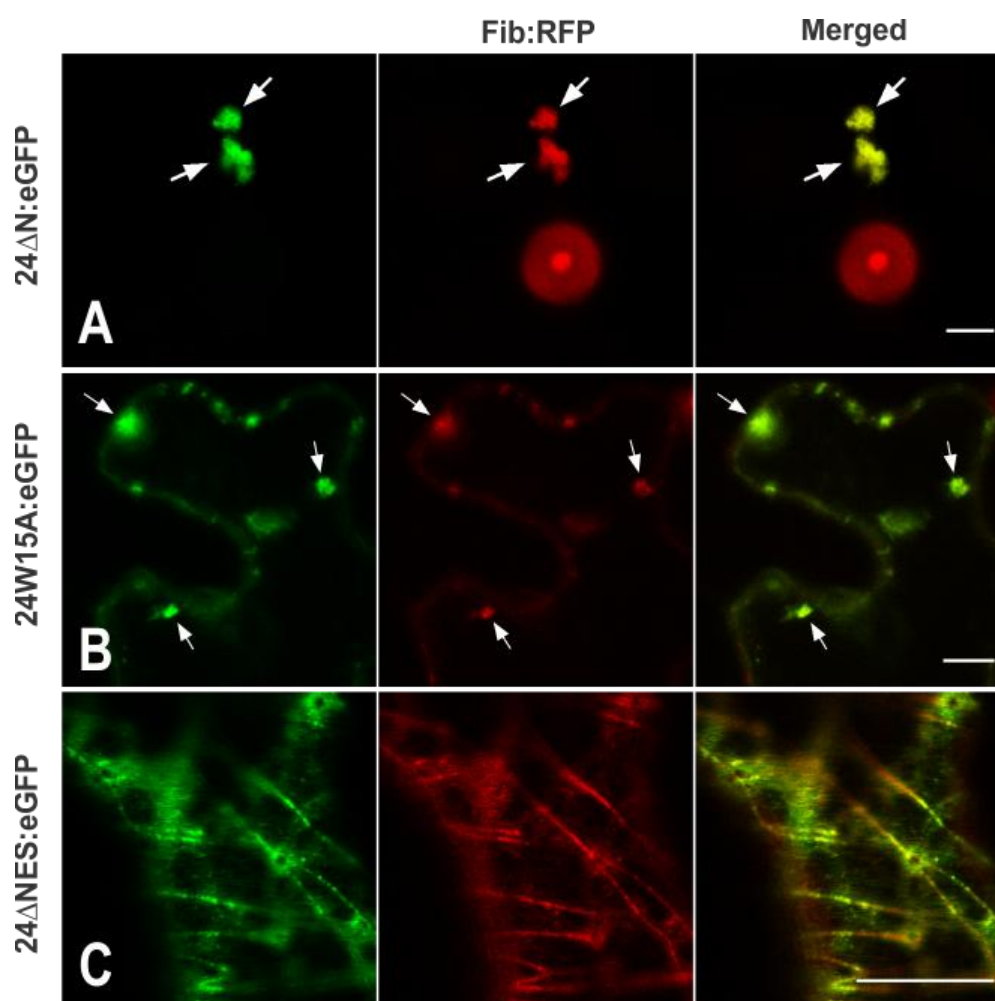


Figura 51. Co-localización en los mutantes de 24K con Fibrilarina en MT y citoplasma. Co-expresión de Fib:RFP con los mutantes 24 Δ N:eGFP (A), 24W15A:eGFP (B) y 24 Δ NES:eGFP (C). Escala=10 μ m

Resta caracterizar la localización en agregados citoplasmáticos de los mutantes 24 Δ NES y 24 Δ C y la localización en MT de 24 Δ N, 24W15A y 24 Δ C.

CONCLUSIONES

- La proteína 24K de CPsV se localiza en nucléolo, CBs y otros agregados subnucleares en células epiteliales de *N. benthamiana*.
- La proteína 24K se localiza en microtúbulos y agregados citoplasmáticos.
- La proteína 24K se asocia con fibrilarina en microtúbulos y agregados citoplasmáticos.
- La región 156-LKKLKIISSNPKE-170 de la proteína 24K estaría involucrada en la fusión de los agregados nucleolares.
- La proteína 24K contiene un motivo WG involucrado en la formación de agregados en nucleoplasma.
- La región C-terminal interviene en la acumulación de la proteína 24K en nucléolo.
- La región C-terminal es requerida para la formación de agregados en nucleoplasma diferentes a los CBs.
- La región N-terminal está involucrada en la localización en CBs y posiblemente en otros agregados en nucleoplasma.
- La región N-terminal no es requerida para la formación de agregados en citoplasma.
- La mutación W15A favorece la acumulación de la proteína en agregados citoplasmáticos.
- La región 156-LKKLKIISSNPKE-170 no es necesaria para la localización de la proteína 24K en microtúbulos.

DISCUSIÓN

Descifrar la localización subcelular de una proteína es crucial para entender su papel biológico. Hemos confirmado que la proteína 24K de CPsV se localiza en nucléolo y agregados en nucleoplasma, dentro de los que se encuentran los CBs y posiblemente los *D-bodies*.

Con el fin de mejorar la caracterización estructural y funcional de la proteína 24K de CPsV se realizó una predicción bioinformática de posibles motivos y dominios funcionales presentes en su secuencia en conjunto con un análisis mutacional de los mismos, lo que permitió determinar que 24K contiene determinados dominios que están vinculados con su localización subcelular. Se encontró la presencia de una posible NES, conservada únicamente en la proteína 23K del ophiovirus BIMaV, indicando alguna probabilidad de encontrarla en otros ophiovirus, y cuando se muta esta región en la 24K, se altera el patrón de localización nucleolar de la proteína.

Por otro lado, hemos confirmado la presencia de un motivo WG/GW de unión a AGO. Cuando en este motivo se sustituye el triptófano 15 por alanina, no se observan agregados en nucleoplasma (diferentes a los CBs), sino una fuerte acumulación de la proteína en el nucléolo y CBs. Una posible explicación a este resultado es que el mutante habría perdido la capacidad de interacción con alguna de las proteínas de la maquinaria de silenciamiento que se localizan en *D-bodies*. En el mutante 24 Δ N, en el cual además se ha perdido el motivo WG/GW, también disminuye la formación de agregados en nucleoplasma. Como en esta región también se encuentra el probable sitio de unión a RNA, y como se ha mencionado, esta proteína tiene la capacidad de unirse a dsRNA largos *in vitro*, probablemente esta mutación altere la función supresora de esta proteína.

Si bien el motivo WG/GW encontrado en la secuencia de 24K no ha sido predicho en ninguna de las proteínas homólogas de los otros integrantes del género *Ophiovirus*, la falta de conservación de este motivo dificulta en gran medida su predicción por los métodos disponibles hasta el momento. Se ha reportado que el motivo WG/GW está implicado en la interacción de varias proteínas VSR con AGO1 (Giner et al., 2010). La mutación del motivo WG en el extremo N-terminal de la NSs de TSWV induce la pérdida concomitante de actividad supresora y Avr (de Ronde et al., 2014). Por lo tanto, es probable que el motivo WG presente en la proteína 24K esté vinculado tanto con su actividad supresora como con su actividad en el procesamiento de miRs, ambas funciones ya demostradas para esta proteína, y coincidentes en su localización subnuclear.

A diferencia de la disminución de agregados en el nucleoplasma en el mutante 24 Δ N, en el mutante 24 Δ C, se observa una disminución de agregados en el nucléolo, incrementándose la acumulación en nucleoplasma, los cuales parecen tratarse exclusivamente de CBs.

Debido a que los servidores actuales no predicen ni NLS ni NoLS presentes en la secuencia de 24K, se propone que la capacidad de llegar a estos compartimentos puede deberse a posibles interacciones con proteínas celulares y posiblemente también virales, aunque no debe descartarse la posibilidad de que estén presentes tales señales pero que no sean identificadas por los servidores disponibles. Una gran variedad de virus de plantas codifican proteínas que se localizan en el nucléolo y CBs para cumplir con funciones como supresoras virales, como es el caso de las proteínas 2b de CMV (Feng et al., 2013; Gonzalez et al., 2010) y p23 de Citrus tristeza virus CTV (Flores et al., 2013; Ruiz-Ruiz et al., 2013).

Hay cada vez más reportes sobre los eventos moleculares desencadenados en las plantas luego de una infección viral, incluyendo alteraciones en la expresión de genes del hospedante, en el metabolismo y en el desarrollo de la planta (Culver and Padmanabhan, 2007; Diaz-Pendon and Ding, 2008; Dunoyer and Voinnet, 2005). Algunas de estas alteraciones podrían ser las responsables de los síntomas causados por los virus en sus hospedantes. Se sabe que los miRNAs (también llamados miRs) son algunas de las moléculas que se ocupan de modular estos eventos (Carrington and Ambros, 2003; Palatnik et al., 2003). De acuerdo con esto, se ha demostrado que tanto la acumulación como la actividad de los miRs resultan alteradas por la infección viral y/o por la expresión transgénica de proteínas virales (Bazzini et al., 2007; Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Dunoyer and Voinnet, 2005; Kasschau et al., 2003). En este sentido, sabemos que el procesamiento del miR156a y miR171a en plantas de *C. sinensis* se ve alterado por la infección con CPsV (Reyes et al., 2016). Así mismo, se ha determinado por ensayos de co-inmunoprecipitación que la proteína 24K se encuentra en asociación con el pre-miR156a y pre-miR171a, lo que sugiere que la alteración del procesamiento de ambos precursores podría deberse a la interacción directa o indirecta con la proteína 24K (Reyes et al., 2016). Debido a que los *D-bodies* son regiones específicas del núcleo donde los pre-miRNAs son procesados por DCL1, la posible localización de 24K en *D-bodies* sería consistente con estos resultados.

La localización en nucléolo y CBs también ha sido relacionada con la actividad de movimiento a larga distancia, como ocurre con la proteína ORF3 del umbravirus GRV (Canetta et al., 2008; Kim et al., 2007a), y las proteínas TGB1 del pomovirus PMTV y del hordeivirus PSLV (Makarov et al., 2016; Semashko et al., 2012). En la proteína ORF3 de GRV, las mutaciones que bloquean su localización nucleolar (o exportación nuclear) dificultan el ensamblaje de partículas de ribonucleoproteínas virales citoplasmáticas y su movimiento a larga distancia, un proceso en el que también está implicada la proteína nucleolar fibrilarina (Canetta et al., 2008; Kim et al., 2007a). La proteína p2 del tenuivirus RSV también interacciona con la fibrilarina y se localiza en nucléolo, siendo ambas características necesarias para el movimiento sistémico del virus (Zheng et al., 2015). Por el contrario, la proteína VPg de PVA, que tiene actividad supresora

dependiente de su localización en nucléolo y CBs, también interacciona con la fibrilarina, pero no afecta su movimiento a larga distancia (Rajamaki and Valkonen, 2009), lo que sugiere un papel diferente de la fibrilarina en las infecciones por GVR y PVA (Talianky et al., 2010). Por lo tanto, es posible que la proteína 24K interaccione con fibrilarina en el nucléolo y que tal interacción esté involucrada en la supresión y/o en alguna etapa del mecanismo de movimiento a larga distancia de CPsV. Un resultado de este estudio, que apoya la hipótesis de que la proteína 24K interviene en el movimiento viral, es su localización en microtúbulos, la cual está asociada con este mecanismo, como ocurre con la proteína de movimiento de TMV (Niehl et al., 2013) y la proteína TGB1 de PMTV (Wright et al., 2010).

Por lo tanto, englobando todos los resultados de la proteína 24K, y en base a la bibliografía, podemos especular que su localización en nucléolo y agregados en nucleoplasma podría estar vinculada con su actividad supresora, con su papel en la alteración del procesamiento de miRs y con un posible rol en el mecanismo de movimiento viral a larga distancia.

PERSPECTIVAS

Debido a que las actividades supresoras de las proteínas 24K y 54K de CPsV no son fuertes, los ensayos de silenciamiento local y sistémico no son de fácil interpretación. Sin embargo, para avanzar con esta caracterización se deberá utilizar esa metodología, al menos en principio, para ensayar tal actividad en los mutantes generados. Así mismo, sería necesario ensayar estos mutantes en su capacidad para unir dsRNAs *in vitro*. En conjunto, esto nos permitirá delimitar los dominios funcionales de la proteína que están relacionados con su actividad supresora.

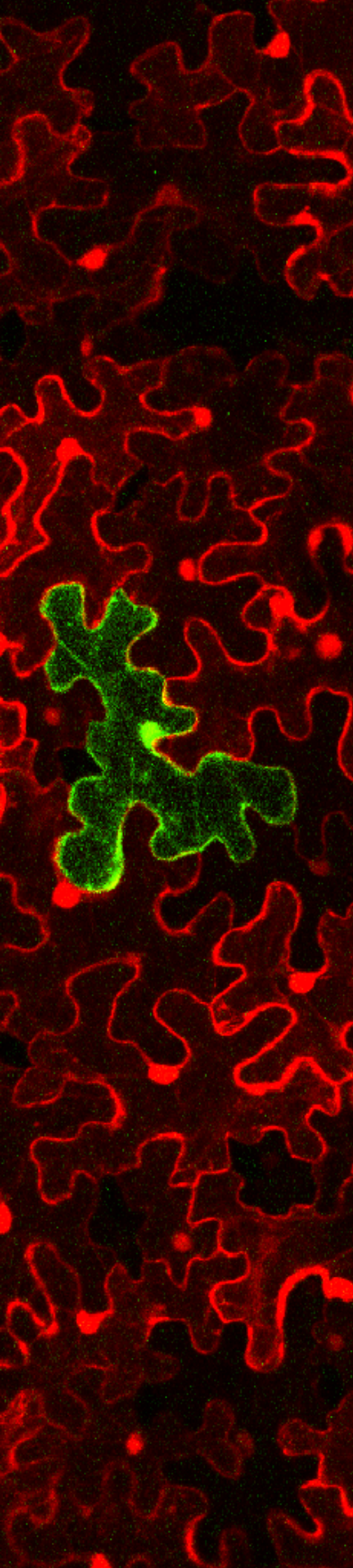
Lograr determinar la naturaleza de los agregados en nucleoplasma también es otra característica importante de la proteína 24K. Para eso, es necesario contar con un marcador de *D-bodies*, que no ha sido utilizado hasta ahora, para corroborar las sospechas mencionadas.

Existen diversas proteínas virales que interaccionan con la proteína nucleolar mayoritaria, la fibrilarina. Tal interacción se ha reportado estar involucrada en el mecanismo de movimiento viral a larga distancia (Canetta et al., 2008; Kim et al., 2007a; Zheng et al., 2015), como en el mecanismo de supresión del silenciamiento de RNA (Rajamaki and Valkonen, 2009). Por lo tanto, resulta de sumo interés estudiar la posible interacción de la proteína 24K con fibrilarina *in vivo* e *in vitro*. Para esto, contamos con las construcciones de fibrilarina para ensayar tal interacción *in vivo* por BiFC. Faltaría generar las construcciones correspondientes de la proteína 24K. Ya que contamos con la proteína fibrilarina fusionada tanto a GFP como a RFP, la interacción *in vitro* podría ser ensayada por ensayos de coimmunoprecipitación usados en nuestro laboratorio (GFP-Trap, RFP-Trap). De lograr confirmar la interacción entre fibrilarina y 24K, podríamos analizar el desarrollo de la infección por CPsV en plantas de *N. occidentalis* silenciadas en fibrilarina. Esto nos permitiría vincular la dependencia del movimiento a larga distancia con la presencia de la fibrilarina. Así mismo, llevar a cabo ensayos de supresión del silenciamiento en las plantas silenciadas, nos permitiría identificar la funcionalidad de tal interacción en el mecanismo de supresión.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los experimentos de localización informados aquí, se llevaron a cabo fuera del contexto de la infección viral, por lo que se necesitan más experimentos que demuestren la dinámica de la localización de la proteína 24K en el proceso de infección por CPsV. Esto podría llevarse a cabo optimizando los ensayos de expresión transitoria mediada por agroinfiltración en plantas de *N. occidentalis*, donde el virus CPsV es capaz de infectar de manera sistémica y sintomática.

Para analizar el posible rol de la proteína 24K en el mecanismo de movimiento a larga distancia de CPsV se propone realizar quimeras virales entre CPsV y virus positivos como TMV, CMV y AMV, donde se reemplacen sus factores de movimiento a larga distancia por distintas

combinaciones de las proteínas de CPsV, entre las que estará la proteína 24K. Luego se ensayará la capacidad de estos virus híbridos de moverse sistémicamente por floema en hospedantes herbáceos como *N. benthamiana* y *N. occidentalis* (ver capítulo 4).



CAPÍTULO 4

Estudio del movimiento viral a
larga distancia de CPsV

INTRODUCCIÓN

1. Transporte viral por el floema

El transporte de los virus por el floema de las plantas es un paso esencial para el establecimiento de la infección sistémica. Este proceso se denomina transporte sistémico, o movimiento a larga distancia.

La infección sistémica del hospedante garantiza la accesibilidad del virus en toda la planta para su posterior transmisión por sus vectores naturales. Así mismo, para la supervivencia del virus es necesario que se acumule en una cantidad elevada en toda la planta, para facilitar su transmisión de una planta a otra, cualquiera que sea el modo de propagación: por semillas, por injertos, por heridas mecánicas o vectores.

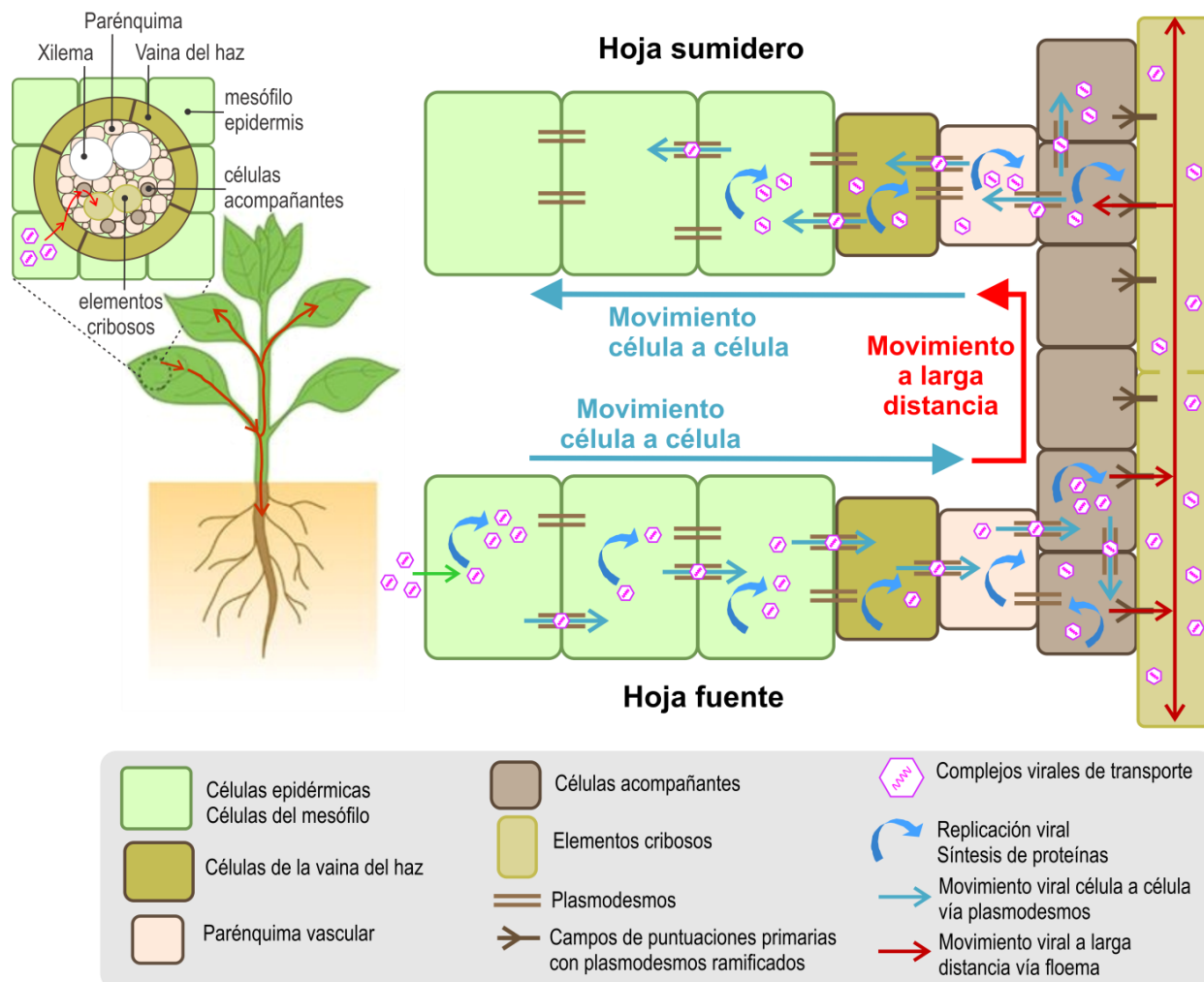


Figura 51. Esquema del transporte viral. Luego de la entrada del virus a las células epidérmicas o del mesófilo, los viriones se desensamblan y comienza la replicación y traducción del genoma viral. Las proteínas virales junto con el genoma viral y proteínas celulares, forman los complejos de transporte (viriones o complejos de vRNPs) que se mueven célula a célula a través de los PDs por los diferentes tejidos hasta alcanzar los elementos cribosos donde son descargados para iniciar el movimiento a larga distancia y finalmente llegar a los tejidos sistémicos donde iniciar nuevos sitios de infección.

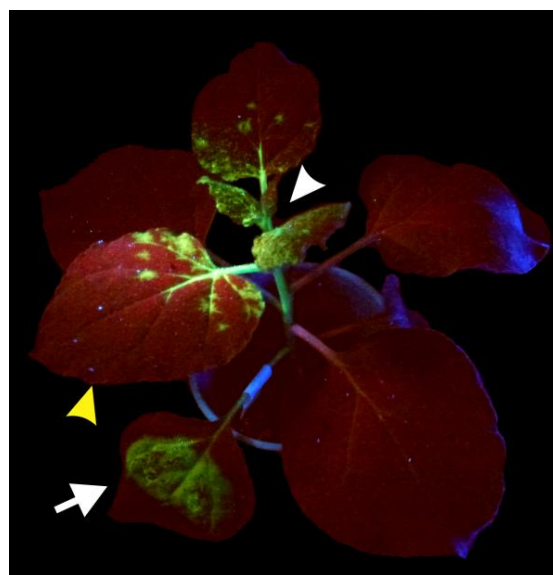
Mientras que el movimiento local implica solamente células epidérmicas y del mesófilo, el movimiento sistémico depende de la capacidad del virus para moverse a través de varios tipos de células diferentes. Si bien se ha observado el transporte de virus a través del xilema, se conoce más acerca del transporte de los virus por tejido floemático (Wan et al., 2015). En la Figura 51 se indica un esquema del recorrido que toma un virus cuando se mueve desde las células epiteliales o del mesófilo, hasta alcanzar los elementos cribosos (SE). Para llegar a los SE, el virus debe moverse desde las células del mesófilo a las de la vaina del haz (BS), y desde éstas a las células del parénquima vascular (VP) y las células acompañantes (CC) desde donde el virus es cargado en los SE. Una vez en los SE, el virus es transportado pasivamente con el flujo de fotoasimilados desde los tejidos fuente a los tejidos sumidero distantes donde puede iniciar nuevos sitios de infección y diseminarse eficientemente a través de toda la planta. Las interfaces celulares entre la vaina del haz y las células del parénquima vascular y entre el parénquima vascular y las células acompañantes, constituyen el principal obstáculo que bloquea la entrada del virus en los elementos cribosos y evita el movimiento viral a larga distancia (Ding et al., 1998; Rajamaki and Valkonen, 2002; Thompson and Garcia-Arenal, 1998). Los mecanismos moleculares que rigen el movimiento a larga distancia de los virus están lejos de ser comprendidos. Mientras que la mayoría de los virus parecen moverse sistémicamente como partículas virales, algunos virus son transportados por los SE como complejos ribonucleoproteicos virales (vRNP).

Dado que los virus se mueven en el floema con el flujo de fotoasimilados, la infección se extiende primero a los tejidos que son fisiológicamente sumidero de fotoasimilados. Por lo tanto, a medida que las hojas maduran y experimentan la transición de sumidero a fuente, hay una disminución progresiva en la cantidad de fotoasimilados y de virus que entran en la lámina. Esta transición en el desarrollo de los tejidos fotosintéticos hace que durante la fase temprana de la infección, sólo se observe una invasión parcial de las hojas maduras, restringiéndose a la región proximal, la cual cuando llegó el virus todavía no había pasado a ser fuente. Todas las hojas jóvenes posteriores se infectan durante la etapa temprana del desarrollo y muestran una infección completa (Figura 52). Además de los cambios en el transporte de fotoasimilados, la transición de sumidero a fuente puede imponer barreras adicionales para el movimiento del virus debido a la diferenciación estructural y funcional de los PDs. Mientras que los PDs en los tejidos sumidero tienen una estructura primaria simple y un SEL bastante grande que permite la difusión libre de macromoléculas tales como GFP, los PDs en los tejidos fuente tienen una estructura secundaria ramificada compleja, y un SEL mucho más restringido (Oparka et al., 1999).

Los mecanismos de movimiento viral célula a célula están cada vez más documentados, pero se sabe mucho menos sobre los mecanismos involucrados en el transporte viral en el sistema

vascular. Esta falta de conocimiento proviene principalmente por la localización física del floema en los órganos de la planta, que lo hace difícil de estudiar. La recolección de savia para identificar los factores del floema que colaboran con los virus en su transporte, puede ser desafiante o incluso imposible dependiendo del hospedante. Además, como la eficiencia del movimiento célula a célula influye en el transporte a larga distancia, estos dos procesos íntimamente conectados son a veces difíciles de separar. Como consecuencia de esto, la identificación de los factores virales y celulares que son específicamente requeridos para el transporte viral a larga distancia representa un gran desafío.

Figura 52. Propagación de la infección por TMV en plantas de *N. benthamiana*. Se utilizó un derivado de TMV que expresa GFP bajo el control del promotor subgenómico de la CP. La hoja inoculada se señala con una flecha blanca. El virus se propaga radialmente en la epidermis y el mesófilo de la hoja inoculada, y finalmente llega a la vasculatura. En el floema vascular, el virus es transportado a hojas superiores no inoculadas (marcadas con puntas de flechas), donde continúa la propagación célula a célula de manera radial. La punta de flecha blanca señala una hoja nueva (sumidero) donde ocurre infección completa, y la punta amarilla una hoja madura donde sólo se infectó la base (proximal). Fotografía tomada en nuestro laboratorio.



1.1. Complejos virales de transporte sistémico

Conocer la naturaleza de los complejos virales de transporte por floema es fundamental para comprender mejor los mecanismos por los cuales los virus invaden sistémicamente a sus hospedantes. Se han descrito dos formas en las cuales el virus se transporta por floema: (1) en forma de viriones, donde el genoma viral está protegido por una cubierta formada por varias unidades de la CP, y (2) en forma de complejos de RNPs, en los que el genoma viral está asociado con proteínas virales y/o celulares (Anexo 1, (Hipper et al., 2013)). Sin embargo, existen casos en los cuales los virus pueden moverse simultáneamente en ambas formas, como ocurre con el pomo virus PMTV (McGeachy and Barker, 2000; Savenkov et al., 2003; Torrance et al., 2009; Torrance et al., 2011; Wright et al., 2010) y el bromo virus BMV (Gopinath and Kao, 2007). Además, la forma viral que circula en la vasculatura puede depender de la planta hospedante y del grado de adaptación del virus al hospedante. Por ejemplo, el begomovirus Bean golden mosaic virus (BGMV) se mueve en *N. benthamiana* y en su

hospedante natural, *Phaseolus vulgaris*, de una manera dependiente de su CP, muy probablemente en forma de virión, pero también puede ser transportado en *P. vulgaris* como complejos de RNPs independientes de la CP, aunque de manera menos eficiente (Jeffrey et al., 1996; Pooma et al., 1996). Un proceso similar se observó con TGMV (género *Begomovirus*) (Pooma et al., 1996) y con TRV (género *Tobravirus*) (Macfarlane, 2010; Swanson et al., 2002).

Se considera que la encapsidación viral es necesaria para proteger los genomas de los virus a RNA para asegurar su integridad en el transporte a través del floema, aunque hasta el momento no se ha encontrado actividad de RNasa en este compartimiento (Doering-Saad et al., 2002; Sasaki et al., 1998). Sin embargo, se ha reportado la presencia de actividad 3'→5' exoribonucleasa en el floema de varias especies y se identificó un proteasoma 26S funcional en exudados de savia de calabaza (Lin et al., 2009) y aminopeptidasas y proteasas en savia de calabaza y *A. thaliana* (Lin et al., 2009), lo que explica la necesidad de los virus de desarrollar estrategias, como el reclutamiento de factores celulares, para proteger sus viriones o complejos de RNPs de estas enzimas proteolíticas.

Los proteosomas también están implicados en el movimiento sistémico viral. Jin et al. (2006) identificaron usando VIGS una subunidad del proteasoma 26S, RPN9, necesaria para el transporte sistémico viral. El silenciamiento de RPN9 en *N. benthamiana* inhibió la diseminación sistémica de TMV y TuMV, probablemente como resultado del desarrollo alterado de la vasculatura. RPN9 podría funcionar regulando el transporte de auxinas y la señalización de brasinoesteroides que es crítica para el desarrollo vascular (Jin et al., 2006)

Aunque la identificación de los factores del hospedante que facilitan el movimiento sistémico viral es crítica para comprender los mecanismos de la infección viral, es igualmente importante conocer a fondo los reguladores negativos del movimiento. En general, los sistemas de defensa del hospedante juegan un papel en la restricción del movimiento sistémico. Los ejemplos incluyen mecanismos de defensa por el silenciamiento génico (Cao et al., 2010), el ácido salicílico (Alamillo et al., 2006) y el etileno (Love et al., 2007). Las proteínas de *Arabidopsis* RTM1 (*Restricted TEV Movement 1*) y RTM2 funcionan dentro del floema para restringir el movimiento a larga distancia viral (Chisholm et al., 2000; Chisholm et al., 2001; Mahajan et al., 1998; Whitham et al., 2000).

1.1.1. La CP en el movimiento a larga distancia

La CP es el factor viral que se encuentra más comúnmente involucrado en el movimiento a larga distancia de los virus de plantas. En general, la CP suele estar asociada con la necesidad de producir partículas virales, pero también puede ser requerida para formar complejos de

RNPs. Sin embargo, se ha reportado que los dominios de la CP requeridos para la encapsidación viral son diferentes de los involucrados en el movimiento a larga distancia. En los potyvirus, por ejemplo, los dominios N- y C-terminal de la CP no son necesarios para la encapsidación del genoma viral, pero son esenciales para el movimiento a larga distancia del virus (Dolja et al., 1995; Dolja et al., 1994).

En cuanto a la necesidad del ensamblaje del virus en el movimiento a larga distancia, se ha demostrado en dos virus de la familia *Tombusviridae*, Turnip crinkle virus (TCV) (Cao et al., 2010), y TBSV (Qu and Morris, 2002), que si bien las partículas no son requeridas para la carga del virus en los tejidos vasculares, son esenciales para su salida eficiente del floema. Esto demuestra que la entrada y la salida de los genomas virales hacia y desde los SE pueden ser controladas por mecanismos moleculares diferentes.

Algunos virus, sin embargo, no necesitan de la CP para moverse sistémicamente, como es el caso de Tomato leaf curl virus (ToLCV, *Begomovirus*) (Padidam et al., 1995, 1996) y TBSV, (Desvoyes and Scholthof, 2002; Qu and Morris, 2002; Scholthof et al., 1993).

1.1.2. La MP en el movimiento a larga distancia

Algunos virus como los geminivirus CMV y Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV, *Dianthovirus*), se valen de la MP para el movimiento a larga distancia (Ueki and Citovsky, 2007; Waigmann et al., 2004a). Al igual que ocurre con la CP, los dominios de la MP involucrados en el transporte a larga distancia son independientes de los implicados en el movimiento célula a célula. Por ejemplo, el dominio C-terminal de la proteína NSm (MP) de TSWV, es esencial para el movimiento sistémico, pero no es requerido para el transporte célula a célula (Lewandowski and Adkins, 2005; Li et al., 2009). Una situación similar ocurre con BMV, donde el dominio C-terminal de su MP no es esencial para el movimiento célula a célula, pero es requerido para el transporte a larga distancia (Takeda et al., 2004).

1.1.3. Supresoras virales en el movimiento sistémico

El silenciamiento de RNA es uno de los mecanismos de defensa antiviral de la planta, que funciona a través de una señal de silenciamiento capaz de propagarse a través de los PDs desde la célula inicial, donde se disparó el silenciamiento, a las células adyacentes, y a larga distancia por la vasculatura de la planta (Kalantidis et al., 2008). Esta señal de silenciamiento viaja por delante del frente de infección, inmunizando los tejidos receptores y previniendo la diseminación sistémica del virus hacia las hojas superiores no infectadas (Ding and Voinnet, 2007; Schwach et al., 2005). Como se mencionó en el capítulo 3, para contrarrestar esta

defensa del hospedante, los virus codifican VRS que interfieren con varios procesos de la vía de silenciamiento (Burgyan and Havelda, 2011). Muchas VRS eran previamente conocidas como factores de virulencia capaces de intensificar los síntomas o promover la infección sistémica (Díaz-Pendón and Ding, 2008). Por ejemplo, la proteína supresora P19 de TBSV es esencial para la diseminación a larga distancia en plantas de espinaca y pimiento, mientras que no es requerida para la infección sistémica de *N. benthamiana* ni de *N. clevelandii*. Esto sugiere que el rol de P19 en el movimiento sistémico es dependiente del hospedante (Scholthof et al., 1995). La proteína P19 de Cymbidium ringspot virus (CymRSV, Tombusvirus) promueve la salida del virus desde los tejidos vasculares a las células circundantes, favoreciendo así la infección de las hojas superiores (Havelda et al., 2003). Un caso similar está representado por la proteína 2b codificada por CMV, la cual potencia la diseminación sistémica del virus de manera dependiente del hospedante. Un aislamiento de CMV que carece del ORF 2b (CMV Δ 2b) no es capaz de infectar sistemáticamente plantas de pepino (Ding et al., 1995). Sin embargo, en plantas de tabaco, el mismo virus fue capaz de propagarse sistemáticamente a las hojas superiores. Estudios adicionales mostraron que la proteína 2b es capaz de impedir la propagación sistémica de la señal de silenciamiento (Brigneti et al., 1998; Guo and Ding, 2002), facilitando la infección de las partes distales de la planta. Por último, la delección del gen codificante de la VRS de BSMV (género *Hordeivirus*) causa el bloqueo del transporte sistémico viral en *N. benthamiana* que puede complementarse con la proteína supresora HC-Pro de los potyvirus expresada transgénicamente (Yelina et al., 2002).

1.2. Casos particulares

Los miembros del género *Umbravirus* representan una situación especial porque no codifican para una CP, pero sin embargo se acumulan y se propagan sistemáticamente de manera muy eficiente dentro de plantas infectadas (Taliensky and Robinson, 2003). El análisis genético de GRV y otro umbravirus, Pea enation mosaic virus-2, mostró que las proteínas codificadas por el ORF3 de estos virus son esenciales para el movimiento a larga distancia y pueden sustituir funcionalmente a la CP de TMV para el movimiento a larga distancia (Ryabov et al., 1999a; Ryabov et al., 2001). Estudios de localización mostraron que la proteína ORF3 de GRV se acumula en gránulos citoplasmáticos de partículas filamentosas de RNP que contienen RNA viral y la proteína ORF3 (Taliensky et al., 2003). Estos gránulos se detectaron en todos los tipos de células y fueron abundantes en las células asociadas al floema. Se sugirió que estas partículas de RNP sirven para proteger el RNA viral, y pueden ser la forma en la que el virus se mueve a través del floema. Como bien se mencionó en el capítulo anterior, además de los gránulos citoplasmáticos, la proteína ORF3 también se encontró en núcleo, dirigiéndose preferentemente al nucléolo (Ryabov et al., 2004; Ryabov et al., 1998). El análisis funcional de

los mutantes de la proteína ORF3 reveló una correlación directa entre la localización nucleolar de la proteína ORF3 y su capacidad para formar las partículas RNP citoplasmáticas y transportarse a larga distancias.

Otra situación particular es representada por los luteovirus, que están restringidos a las células del floema, como Potato leaf roll virus (PLRV). Debido a que el movimiento en los tejidos del parénquima es limitado, la diseminación sistémica depende casi exclusivamente del movimiento a larga distancia a través del floema. Estos virus se replican en las células del parénquima vascular y en las células acompañantes y codifican proteínas de movimiento que facilitan el transporte célula a célula entre estas células y los SE, sin embargo no facilitan el movimiento del virus entre las células de mesófilo (Savenkov and Valkonen, 2001; Taliansky et al., 2003). Resulta interesante que la proteína MP de 17kDa de PLRV tenga propiedades muy similares a la MP 30K de TMV, por ejemplo, unión a ssRNA, dimerización, fosforilación por una quinasa unida a membrana, localización en plasmodesmos tanto en plantas infectadas con virus, como en transgénicas que expresan la 17K, y la capacidad de aumentar el SEL de los PDs (Schmitz et al., 1997; Sokolova et al., 1997; Tacke et al., 1991; Tacke et al., 1993). La acumulación exclusiva en las células del floema puede promover la transmisión del virus por los vectores que adquieren viriones cuando se alimentan del floema. Además, la replicación de los luteovirus en las células del floema induce trastornos fisiológicos que son atractivos para el vector, como la alteración del contenido de aminoácidos y de azúcar de la savia del floema. Cabe señalar que PLRV también puede utilizar otra estrategia para el movimiento por el floema que es independiente de la MP, donde la CP y su producto de *readthrough* (la proteína RT), están involucrados en la propagación sistémica del virus (Talianky et al., 2003).

2. Estudio del movimiento a larga distancia en virus a RNA negativos

Debido a la dificultad para generar clones infectivos de virus a RNA negativo, se han planteado y aplicado varias estrategias para el estudio de la función de sus genes. Por ejemplo, en el caso del transporte sistémico de RSV, un virus multipartito de polaridad negativa, los autores usaron una estrategia basada en VIGS (*virus induced gene silencing*). Para esto, indujeron el silenciamiento de la proteína viral p2 (gen NS2) en plantas de *N. benthamiana* usando un sistema de VIGS basado en TRV (Kim et al., 2007a). Doce días posteriores a la infección con TRV-NS2, las plantas se inoculaban con RSV en las hojas superiores, encontrando que a los 40dpi, las hojas sistémicas no desarrollaban síntomas característicos de RSV, ni se detectó el virus por RT-PCR. Sin embargo, RSV se acumuló en las hojas inoculadas, donde se determinó por qRT-PCR una reducción del 55% de expresión del gen NS2 con respecto a las plantas control tratadas con TRV vacío. Esto les permitió concluir que la proteína p2 estaría cumpliendo

algún rol en el transporte sistémico de RSV (Zheng et al., 2015). En el mismo trabajo, determinaron que p2 se localiza en nucléolo e interacción con fibrilarina, y que el silenciamiento de fibrilarina impide el movimiento de RSV en *N. benthamiana* y modifica el patrón de localización nucleolar de p2.

Actualmente el estudio del transporte sistémico se realiza de manera indirecta, probando la capacidad de sus proteínas aisladas de soportar el movimiento a larga distancia de variantes de virus positivos como TMV, AMV y CMV que son defectivos en el transporte sistémico. Esta estrategia consiste en generar híbridos de estos virus con genoma positivo y el virus negativo a estudiar, reemplazando la proteína encargada de facilitar el movimiento sistémico del virus-vector por la/las proteínas del virus negativo. El factor de movimiento viral a larga distancia de TSWV, la proteína NSm, se determinó de esta manera. En ese caso, el ORF de la NSm se clonó en reemplazo del gen de la MP de un vector viral TMV Δ CP (la CP de TMV es esencial para el movimiento sistémico de TMV) y se estudió su capacidad de soportar el movimiento sistémico de TMV, encontrándose que este híbrido es capaz de moverse desde las hojas inoculadas a las superiores, además de inducir síntomas (Lewandowski and Adkins, 2005). Este tipo de híbrido también se ha ensayado con virus a RNA positivos para los cuales no estaba desarrollado un clon infectivo, por ejemplo GRV. En ese caso se reemplazó la CP de TMV por el ORF3 de GRV, encontrándose que el virus híbrido fue capaz de diseminarse sistémicamente aún en ausencia de su CP, por lo que la proteína ORF3 puede reemplazar funcionalmente a la CP, facilitando el movimiento sistémico del RNA viral de TMV de manera no encapsidada (Ryabov et al., 1999b). Un híbrido similar se realizó entre AMV y TMV, donde el reemplazo de la CP de TMV por la CP de AMV produjo virus híbridos capaces de infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana*, *N. tabacum* MD609 y *Spinacea oleracea* (Spitsin et al., 1999).

3. Cucumber mosaic virus (CMV) como modelo para el estudio del movimiento viral

Cucumber mosaic virus (CMV) es un virus tripartito icosaédrico, que posee el rango de huéspedes más amplio entre los virus de plantas conocidos hasta el momento. Además de su capacidad de infectar una gran cantidad de especies de plantas diferentes, su acumulación en sus hospedantes, la capacidad de realizar transmisiones mecánicas, y principalmente, la disponibilidad de cDNAs infectivos para estudios de genética reversa, lo convierten en uno de los modelos más convenientes para la investigación en plantas.

En la Figura 53 se muestra un esquema de la organización genómica de CMV. Se ha demostrado que casi todas las proteínas virales de CMV afectan tanto el movimiento célula a célula como el transporte sistémico, no obstante, se considera que la proteína 3a es la MP

principal (Canto et al., 1997; Jacquemond, 2012; Kaplan et al., 1995; Nagano et al., 1997), ya que posee las principales características de una MP. La MP^{CMV} (proteína 3a) pertenece a la superfamilia 30K de MPs virales (ver Capítulo1) y junto con el RNA viral pueden formar complejos de RNPs (Andreev et al., 2004; Kim et al., 2004). La MP^{CMV} también tiene la capacidad de generar estructuras tubulares en la superficie de protoplastos de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Canto and Palukaitis, 1999a), sin embargo, tales túbulos no se observan en células de *Nicotiana clevelandii* infectadas por CMV (Blackman et al., 1998). Además, una versión mutante de 3a incapaz de formar túbulos, aún puede dirigir el movimiento tanto local como sistémico de CMV en varios hospedantes (Canto and Palukaitis, 1999a; Li et al., 2001). Estos resultados sugieren que estas estructuras tubulares no serían requeridas para el movimiento *per se* pero podrían ser necesarias para el movimiento entre algunos tejidos/células en particular, y/o en ciertos hospedantes (Guiu-Aragones et al., 2016; Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003).

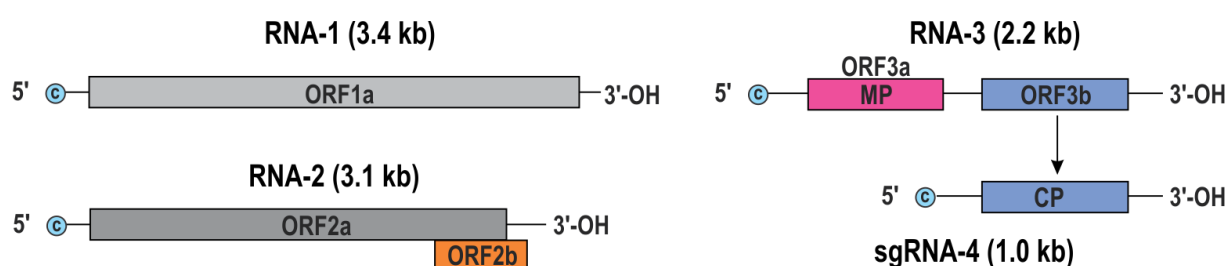


Figura 53. Organización genómica de *Cucurbit mosaic virus* (CMV). Genoma segmentado, compuesto de tres RNAs lineales: RNA1, RNA2 y RNA3. El RNA1 y RNA2 codifican las proteínas 1a y 2a, respectivamente, ambas involucradas en la replicación del genoma y en la transcripción del sgRNA4 a partir de la copia negativa del RNA3. El RNA3 y el sgRNA4 codifican para la proteína de movimiento y para la proteína de cubierta, respectivamente. El ORF2 codifica para la proteína supresora 2b. Los cuadrados representan los ORFs. Se indica la longitud de cada segmento de RNA.

Hay varias evidencias que indican que el virus se mueve a través de los PDs en forma de complejo de RNPs y que tanto la proteína 3a como la 3b (CP) serían requeridas (Boccard and Baulcombe, 1993; Canto et al., 1997; Suzuki et al., 1991). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la CP no sería necesaria (Ding et al., 1995; Nguyen et al., 1996). Por lo tanto, en diferentes ensayos se han indicado diferentes requisitos para el movimiento de CMV, sin demostrar de manera concluyente cómo la proteína de la cápside participa en el movimiento célula a célula. Aún así, se ha propuesto un modelo en el que se piensa que el papel de la proteína 3b sería inducir un cambio conformacional en la proteína 3a, dando como resultado un cambio funcional de la misma (Ryabov et al., 1999a).

En cuanto al movimiento a larga distancia de CMV, se cree que se mueve por la vasculatura en forma de partículas virales (Requena et al., 2006). Sin embargo, no se han observado viriones

dentro de los PDs (Ding et al., 1995), ni siquiera entre las células acompañantes y los elementos cribosos (Blackman et al., 1998). Diferentes estudios muestran que todas las proteínas virales de CMV pueden tener efectos sobre el movimiento a larga distancia, aunque las proteínas CP, MP y 2b parecen ser los principales actores. Hay varias evidencias que indican que la MP^{CMV} también está involucrada en el movimiento a larga distancia, ya que mutantes de MP^{CMV} en los que se suprime la región C-terminal no son capaces de invadir sistemáticamente las plantas de tabaco (Kim et al., 2004).

Debido a que ni la traducción ni la replicación ocurren en los elementos cribosos maduros, se ha propuesto que el RNA y la CP tendrían que ser transportados (por la proteína 3a) a los elementos cribosos y ensamblados allí en partículas virales (Blackman et al., 1998). Estas partículas serían entonces transportadas a través del sistema vascular. Deleciones próximas al extremo N-terminal de la secuencia de la CP provocan un efecto negativo sobre el movimiento del virus, que es independiente de los efectos producidos en la encapsidación (Kaplan et al., 1998; Schmitz and Rao, 1998). Estos datos indican que la CP libre, es decir, no formando parte de las partículas virales, es esencial para el movimiento a larga distancia y confirma los resultados que indican que la formación de las partículas virales no es necesaria para el movimiento célula a célula en algunos hospedantes.

HIPÓTESIS

- El transporte a larga distancia de CPsV está regulado por la actividad de su MP.

OBJETIVOS

Hasta el momento no hay estudios relacionados con el movimiento sistémico de los ophiovirus, por lo tanto, nos propusimos avanzar en este conocimiento. Sabiendo que la MP de CPsV es el factor viral de movimiento célula a célula, y sabiendo que el paso por el núcleo de MP^{ophiovirus} podría ser un paso importante para el movimiento eficiente a larga distancia, nos propusimos analizar si la proteína MP^{CPsV} está involucrada en el transporte sistémico de CPsV, mediante el uso de vectores virales. Para esto, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Generar híbridos de virus con genoma positivo que expresen la proteína MP de CPsV en reemplazo del factor de movimiento sistémico.
2. Analizar la capacidad de estos híbridos de soportar el movimiento sistémico en hospedantes herbáceos.
3. Analizar la capacidad de movimiento a larga distancia de TMV Δ CP y CMV Δ MP en líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan las proteínas CP y MP de CPsV

RESULTADOS

1. Estudio del movimiento sistémico de un virus híbrido CMV-CPsV

Como estrategia para estudiar el rol de la proteína MP^{CPsV} en el transporte sistémico, se empleó un el vector viral basado en CMV. En este vector, se reemplazó el ORF de su MP^{CMV} (factor de movimiento a larga distancia de CMV) por el ORF de la MP^{CPsV}.

1.1. Estudio de la capacidad de MP^{CPsV} de transcomplementar el movimiento célula a célula de un vector viral CMVΔMP

Como paso previo a la generación del híbrido CMV-CPsV, fue necesario asegurarse que la MP de CPsV sea capaz de transcomplementar el movimiento célula a célula del mismo vector viral CMV defectivo en este movimiento, ya que si no posee esa capacidad, tampoco podrá mover el virus a otras partes de la planta. Para esto, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* que portaban las construcciones para la expresión de: RNA1 y RNA2 de CMV más la MP^{CPsV}:mRFP, o mas mRFP libre (control negativo), o más la MP^{CMV} (control positivo), en conjunto con cultivos diluidos de *Agrobacterium* conteniendo una versión del RNA3 de CMV donde se reemplazó la MP por erGFP (RNA3ΔMP::erGFP) (Figura 54) (Shen et al., 2014).

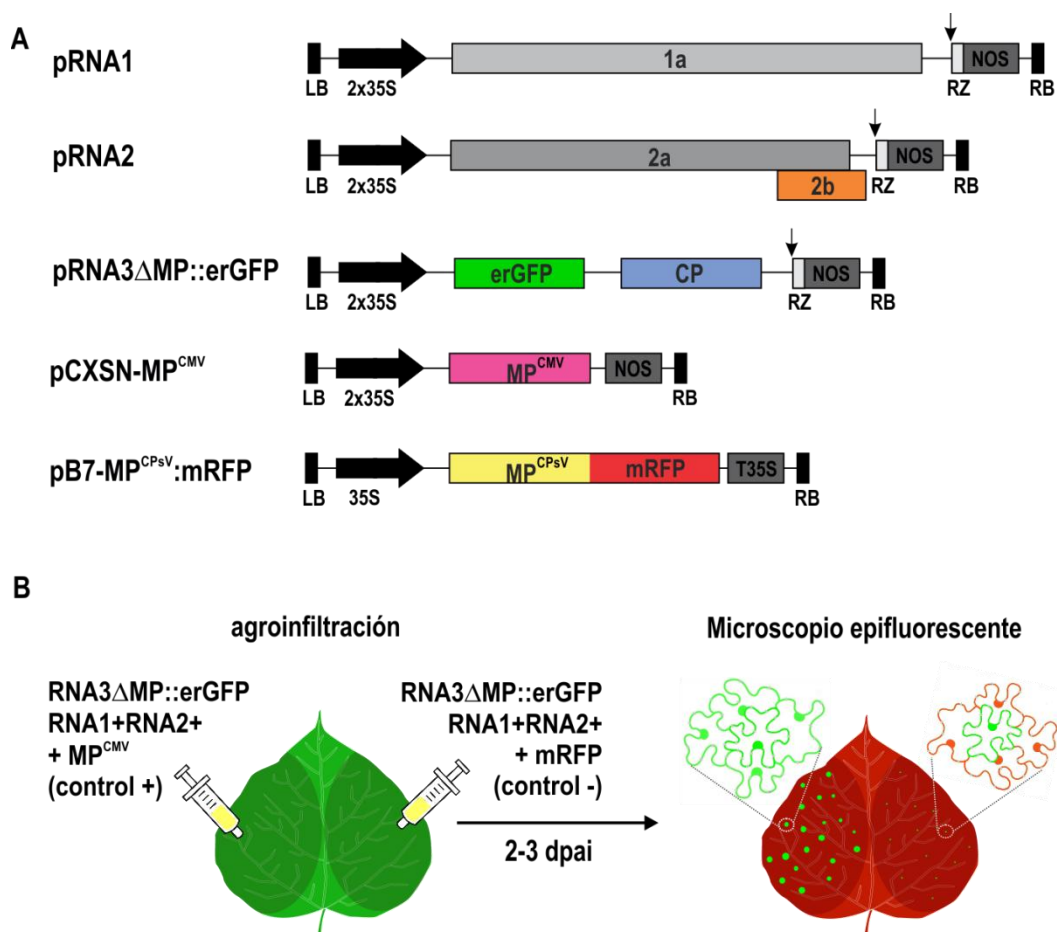


Figura 54. A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas en el ensayo de transcomplementación del movimiento célula a célula de CMV. Los cDNAs completos del RNA1 y RNA2 genómico de CMV se encuentran clonados bajo el promotor 2×35S en el vector binario pCB301. En la construcción pRNA3ΔMP::erGFP, se clonó el cDNA del RNA3 genómico y se reemplazó la MP por erGFP para generar el reportero, deficiente en movimiento. RZ=Ribozima, LB y RB=borde izquierdo y borde derecho del T-DNA en el vector binario, respectivamente. NOS=terminador NOS. Las proteínas 1a y 2a forman el complejo de replicasa. La proteína 2b es supresora del silenciamiento de RNA. MP y CP representan, respectivamente, la proteína de movimiento y la proteína de cubierta. Para la sobreexpresión ectópica de la MP de CMV (usada como control positivo) se utilizó el vector binario pCXS-N-MP^{CMV}. Para la expresión ectópica de la MP de CPsV se usó el vector pB7-MP^{CPsV}:mRFP (Robles Luna et al., 2013). T35S=terminador 35S de CaMV B) Esquema experimental del ensayo de transcomplementación del movimiento viral célula a célula de CMV.

Luego de 2dpai, se analizó por microscopía de fluorescencia la aparición de focos de expresión de GFP. Se encontró que en las hojas que co-expresaban la mRFP libre se generaron focos puntuales de fluorescencia que corresponden a una única célula (Figura 55, panel A), mientras que en las hojas que co-expresaban la MP^{CPsV}:mRFP se generaron focos de GFP de mayor diámetro, es decir, de varias células, similares a los formados durante la co-expresión de la MP^{CMV} (Figura 55, panel B). Estos resultados indican que la expresión ectópica de MP^{CPsV} complementa eficientemente el movimiento intercelular de CMVΔMP, por lo que puede ser utilizado como vector para estudiar el movimiento sistémico.

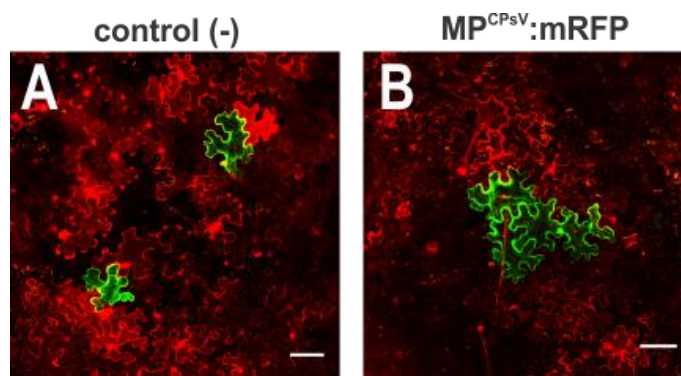


Figura 55. Ensayo de transcomplementación del movimiento célula a célula de CMVΔMP. Imágenes representativas del tamaño de los focos de expresión de RNA3ΔMP::erGFP de hojas expresando RNA1, RNA2 y RNA3ΔMP::erGFP junto con (A) mRFP (control negativo) o (B) MP^{CPsV}:mRFP. Las imágenes se tomaron con microscopio confocal a 2 dpi. Escala=100μm.

1.2. Generación de un virus híbrido CMV-CPsV para el estudio del movimiento a larga distancia

Se analizó si la MP de CPsV reemplaza funcionalmente a la MP de CMV en el transporte sistémico del vector CMVΔMP defectivo en movimiento a larga distancia. Para esto, el primer paso fue obtener un virus híbrido CMV-CPsV, para lo cual se generó una quimera del RNA3 de CMV utilizando como base el plásmido pCB301-CMVRNA3 (Shen et al., 2014) donde se reemplazó el gen de la MP de CMV por el ORF de la MP de CPsV (Figura 56). De esta forma se obtuvo la quimera RNA3ΔMP::MP^{CPsV} que se utilizó en los ensayos que se describirán en el siguiente punto.

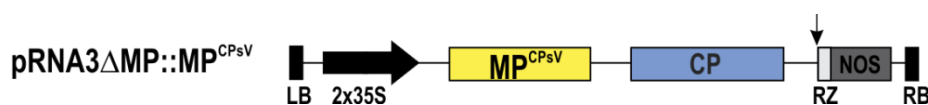


Figura 56. Representación esquemática de la quimera viral RNA3ΔMP::MP^{CPsV} utilizada en los ensayos de movimiento a larga distancia.

1.3. Análisis del transporte sistémico del virus híbrido CMV-CPsV en plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt

Para estudiar el transporte sistémico del virus híbrido CMV-CPsV se utilizaron plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt. Estas dos especies varían en la susceptibilidad frente a CPsV; *N. benthamiana* es hospedante local y asintomático de CPsV, mientras que *N. occidentalis* es sistémico y sintomático (Figura 57). Debido a que CPsV sería capaz de

moverse por floema en *N. occidentalis*, mientras que queda restringido al sitio de infección inicial en *N. benthamiana*, esperamos encontrar diferencias en la capacidad de la MP de complementar a CMV en ambos hospedantes. Los síntomas de infección por CMV en *N. occidentalis* se presentan como deformaciones de hojas e inflorescencias nuevas, disminución del crecimiento de inflorescencias y necrosis de las hojas maduras (Figura 57, panel B). En *N. benthamiana* se observan mosaicos y acartuchamiento de hojas jóvenes, y disminución del crecimiento general de la planta (Figura 57, panel E). La infección de *N. occidentalis* por CPsV muestra síntomas de clorosis y necrosis de hojas e inflorescencias y deformaciones foliares (Figura 57, panel C).

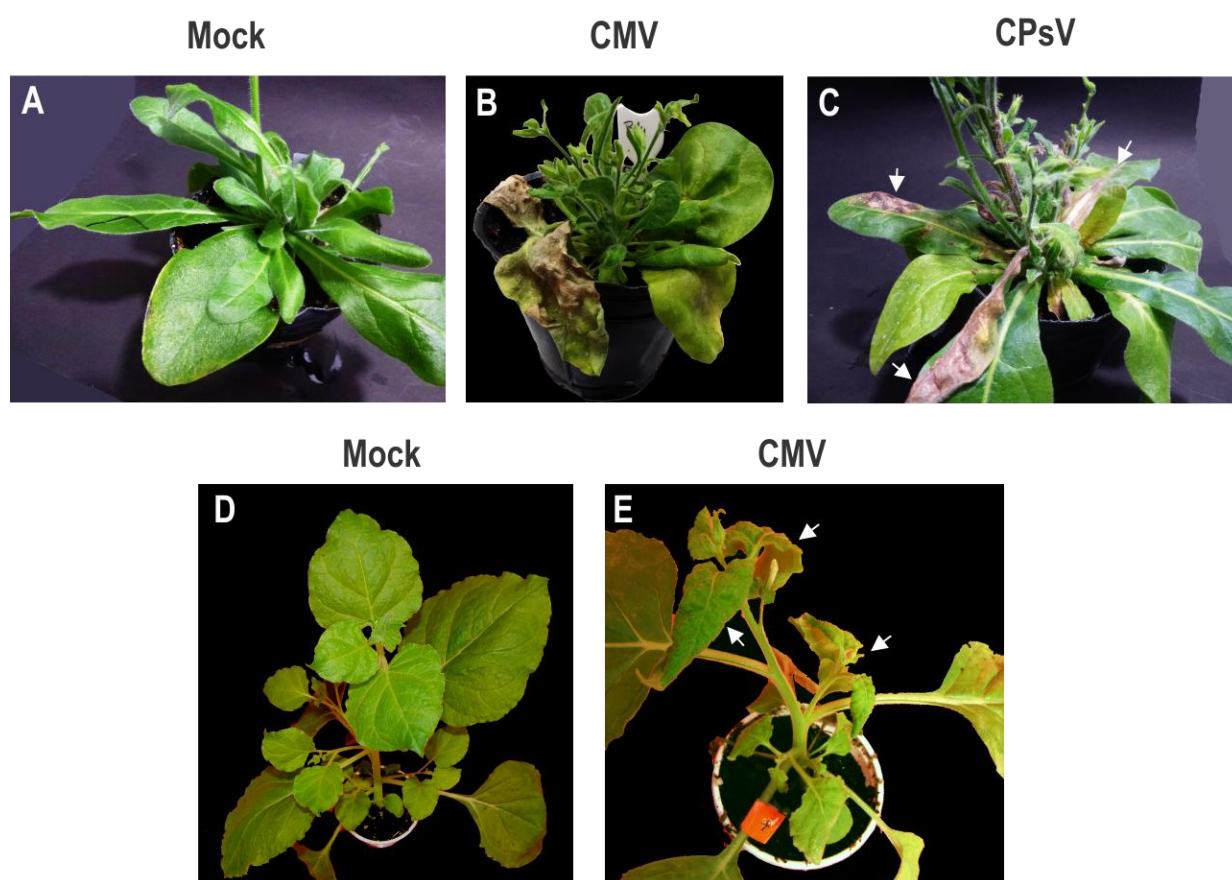


Figura 57. Plantas de *N. occidentalis* mock inoculadas (A), infectadas con el aislamiento CPV-4 de CPsV (B), e infectadas con CMV (C). Plantas de *N. benthamiana* mock inoculadas (D) e infectadas con CMV (E). Las plantas de *N. benthamiana* infectadas con CPsV son indistinguibles de las plantas inoculadas con buffer (no se muestran). Las flechas blancas señalan hojas sistémicas y sintomáticas.

En la Figura 58 se muestra un esquema del diseño experimental utilizado en los ensayos de movimiento viral a larga distancia.

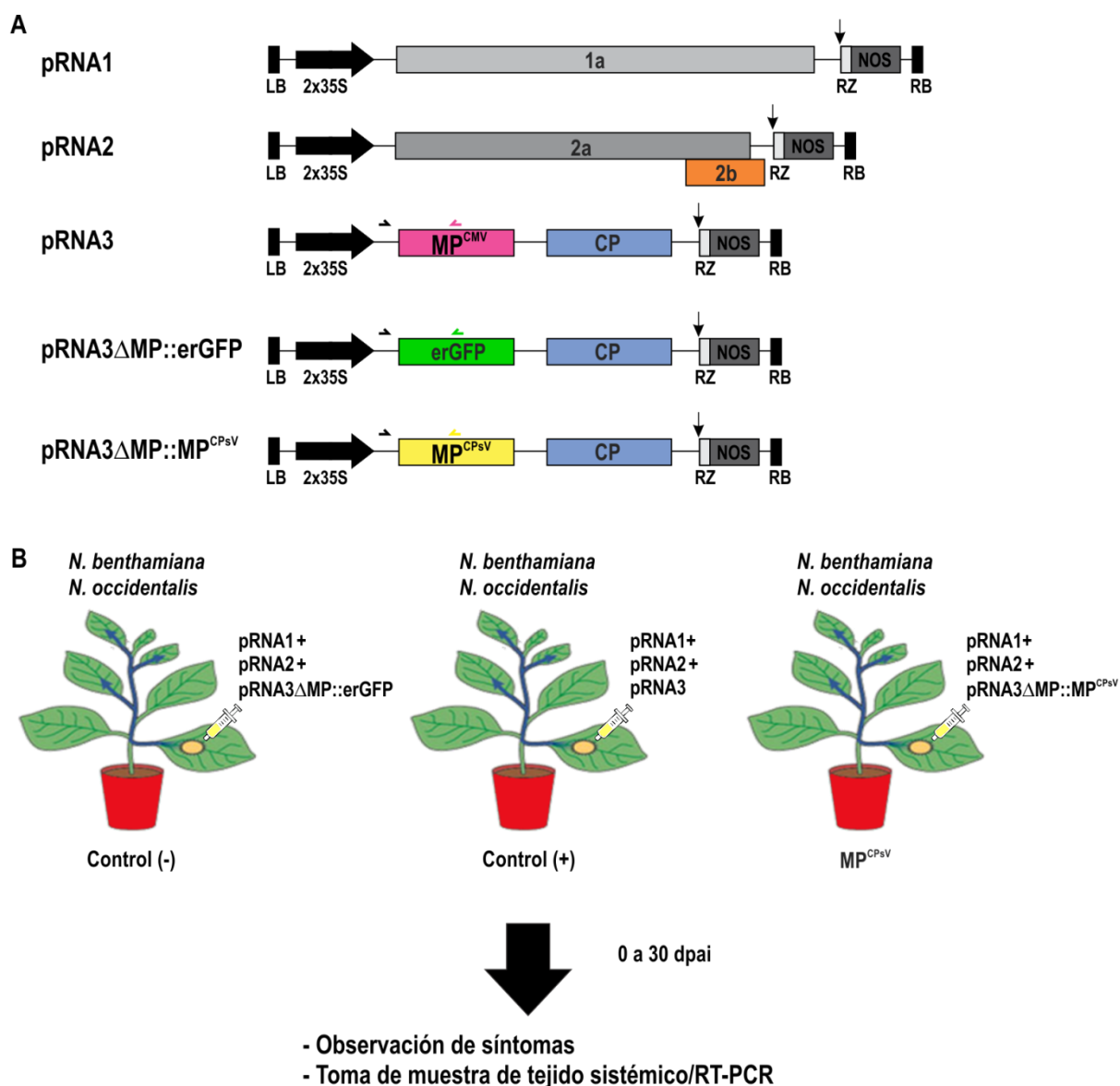


Figura 58. Diseño experimental de los ensayos de movimiento a larga distancia. A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas. Se muestra la ubicación aproximada de los cebadores usados en los ensayos de RT-PCR. En color se señalan los cebadores reversos usados en la reacción de retrotranscripción B) Esquema experimental.

Se co-agroinfiltraron ambas especies de *Nicotiana* con el RNA1 y RNA2 de CMV junto con la quimera RNA3ΔMP::MP^{CPsV}, o el reportero RNA3ΔMP::erGFP (control negativo), o el RNA3 (control positivo). A partir de 10 dpi y hasta los 30 dpi, se analizaron las hojas superiores en busca de síntomas típicos de CMV, de las cuales se tomaron muestras para su posterior análisis por RT-PCR. A partir de los 10 dpi las plantas que coexpresaban la quimera RNA3ΔMP::MP^{CPsV} mostraron síntomas característicos de CMV en las hojas superiores, lo que indica que el virus fue capaz de moverse sistémicamente. En cuanto al tamaño de las plantas, a partir de los 15 dpi se observa claramente que el crecimiento es intermedio entre el control negativo sin infectar y el control positivo infectado con CMV wt (Figura 59, panel A). Se

realizaron dos ensayos independientes en *N. benthamiana* encontrándose resultados similares, como se muestra en la tabla (Figura 59, panel B).

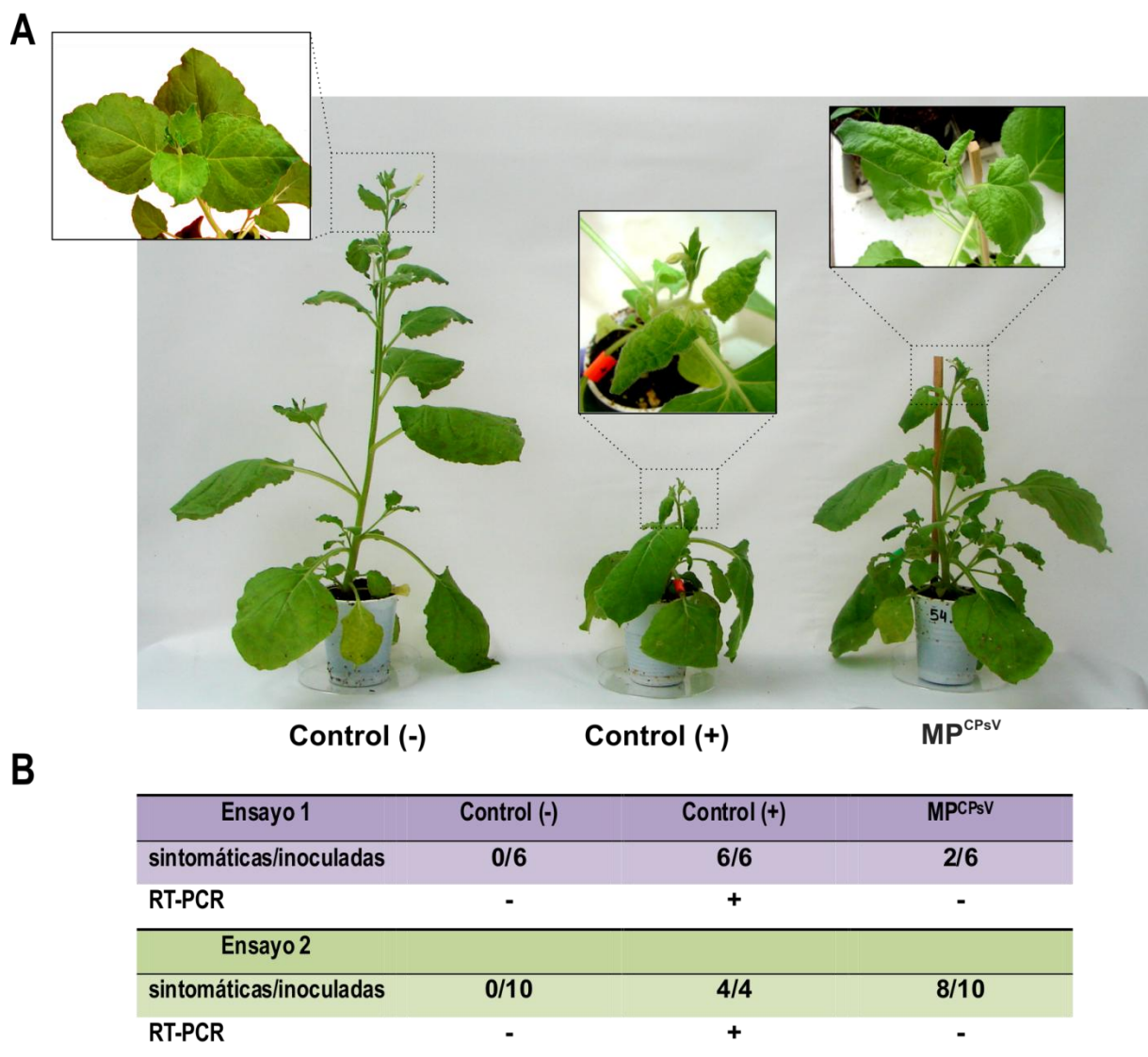


Figura 59. Ensayo de infección sistémica en plantas de *N. benthamiana*. A) Plantas de *N. benthamiana* representativas de un ensayo de movimiento sistémico a 18 dpai B) Resultados de dos ensayos independientes de movimiento a larga distancia. Sintomáticas/inoculadas=n° de plantas que mostraron síntomas sistémicos/n° de plantas inoculadas.

El progreso de la infección por las distintas variantes de CMV (incidencia vs tiempo), se muestra en la Figura 60. Se encontró que en las plantas inoculadas con el virus híbrido la aparición de síntomas se retrasó con respecto a las plantas control infectadas con CMV wt, y la incidencia final es más baja. En el caso de las plantas inoculadas con el virus wt, los síntomas comienzan a observarse a partir de los 7-8 dpai, alcanzando el 100% de incidencia a los 10 dpai; mientras que las plantas inoculadas con el virus híbrido CMV-CPsV comienzan a mostrar

síntomas a partir de los 10 dpai, alcanzando el valor máximo de incidencia (aproximadamente el 60%) luego de los 20 dpai.

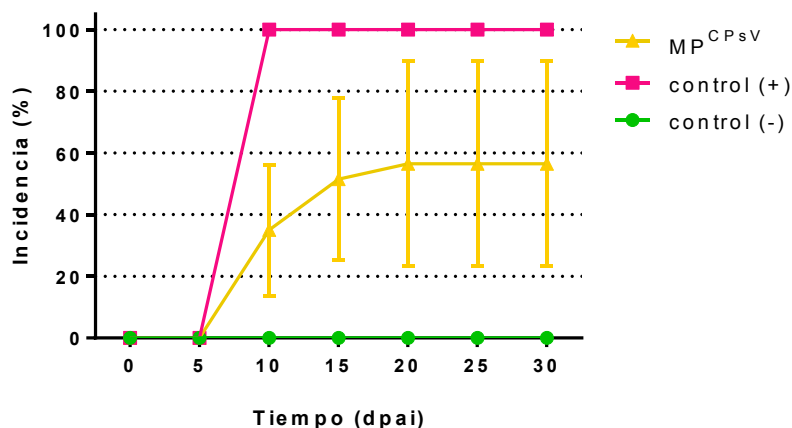


Figura 60. Progreso de la infección de las distintas variantes de CMV en plantas de *N. benthamiana*. Los valores de incidencia (% plantas sintomáticas/plantas inoculadas) corresponden a la media de los dos ensayos, con su correspondiente desviación estándar (barras de error).

En conjunto, los resultados obtenidos indican claramente una diferencia en la eficiencia de ambas MP (la de CPsV y la de CMV) para mover el genoma viral de CMV de manera sistémica y/o local en plantas de *N. benthamiana*, siendo esto una evidencia de que la MP de CPsV puede complementar el movimiento sistémico de CMV.

Para corroborar estos resultados, se realizaron RT-PCR. En la Figura 58 se indican los cebadores utilizados, siendo los reversos aquellos que hibridan en la región diferencial de cada una de las quimeras de RNA3, es decir, en el ORF erGFP de RNA3ΔMP::erGFP (control negativo), en el ORF MP^{CPsV} de RNA3ΔMP::MP^{CPsV}, o en el ORF MP^{CMV} del RNA3wt (control positivo). Los análisis de las plantas control dieron los resultados esperados, mientras que las muestras de las plantas “MP^{CPsV}” dieron negativas, lo que puede deberse tanto al diseño de los cebadores como a la falta de optimización de las reacciones. Aún así, como los síntomas son muy claros, es alentador a continuar con dicha optimización para confirmar los resultados. Otro factor a tener en cuenta es la estabilidad del RNA3 quimera cuando el virus establece la infección en las hojas superiores. Por lo tanto, se diseñarán cebadores en la CP de CMV con el fin de detectar si al menos el virus ha podido transportarse hasta las hojas superiores, independientemente de lo que haya sucedido con la estabilidad del gen de la MP^{CPsV} en el RNA3 de CMV.

En cuanto al ensayo realizado en *N. occidentalis*, se observó que a partir de los 15-20 dpai comienzan a observarse deformaciones en hojas sistémicas en las plantas control. Para las plantas agroinfiltradas con el virus híbrido, encontramos que sólo 2 de 10 mostraron un retraso en el crecimiento en comparación a las plantas control. En las mismas plantas, también se observaron síntomas foliares más tenues que las plantas inoculadas con el virus wt, sin llegar a la necrosis pero mostrando algunas deformaciones en las hojas mas nuevas (Figura 61).

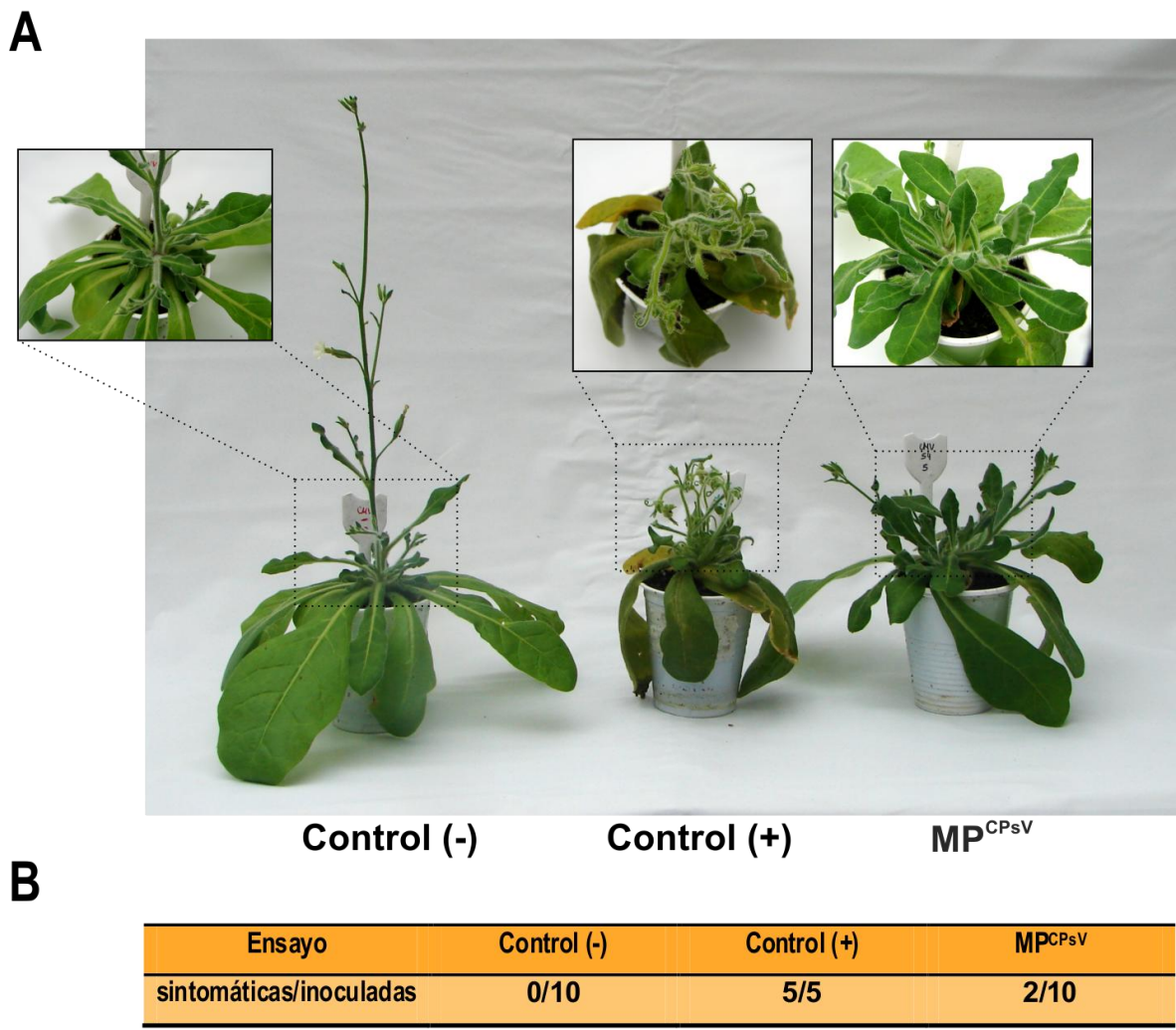


Figura 61. Ensayo de infección sistémica en plantas de *N. occidentalis*. A) Plantas de *N. occidentalis* representativas de un ensayo de movimiento sistémico a 30 dpai B) Resultados de un ensayo de movimiento a larga distancia. Sintomáticas/inoculadas=n° de plantas que mostraron síntomas sistémicos/n° de plantas inoculadas.

Si bien falta confirmar la presencia del virus en las hojas superiores por RT-PCR, los resultados preliminares obtenidos indicarían que el virus híbrido es capaz de moverse sistémicamente en *N. occidentalis*. No obstante, se realizarán más ensayos con un número mayor de plantas para confirmar estos resultados.

2. Análisis de la capacidad de complementar en *trans* el movimiento a larga distancia de virus positivos defectivos usando líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan las proteínas MP y CP de CPsV

En el laboratorio contamos con líneas transgénicas de *N. benthamiana* denominadas 54 y 48 que expresan de forma estable y constitutiva las proteínas MP^{CPsV} y CP^{CPsV}, respectivamente, bajo el promotor 35S. Se ha demostrado que estas proteínas se expresan en tejido foliar, pero no se ha confirmado que estas proteínas se expresen en todos los tejidos de la planta. Suponiendo que así lo hacen, se analizó la capacidad de complementar el movimiento a larga distancia de dos virus mutantes a RNA positivo defectivos en esta función.

2.1. Estudio de la capacidad del virus CMV Δ MP de infectar sistémicamente plantas de la línea 54:06 de *N. benthamiana*

Se ensayó la capacidad del virus CMV Δ MP de transportarse sistémicamente en la línea de *N. benthamiana* transgénica 54:06, para lo cual se agroinfiltraron plantas de esta línea con el vector viral CMV Δ MP::erGFP y se analizó la presencia del virus en las hojas superiores mediante observación de síntomas sistémicos (Figura 62).

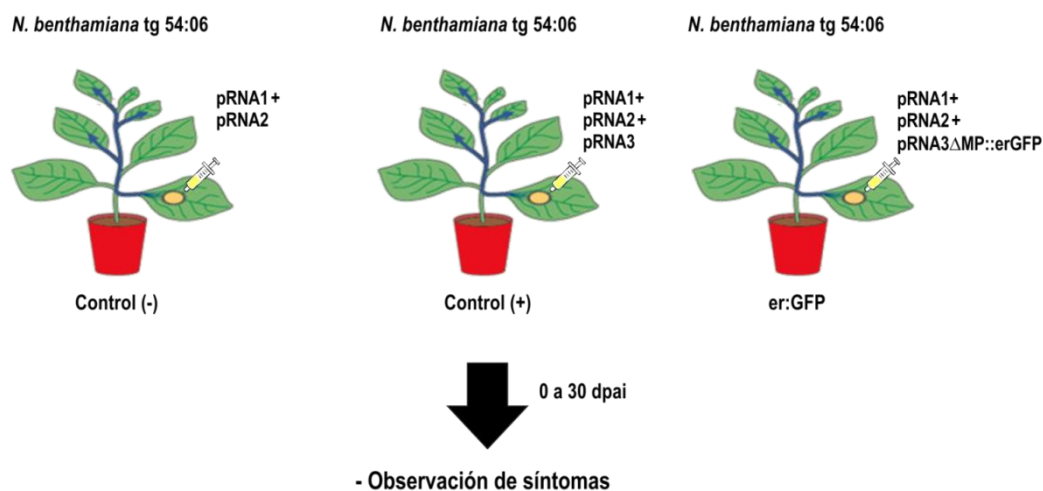


Figura 62. Esquema experimental de los ensayos de infección por CMV de plantas de la línea 54:06 de *N. benthamiana*.

Se realizaron dos ensayos independientes obteniéndose resultados similares (Figura 63). Primeramente se encontró que el virus CMV wt se mueve eficientemente en esta línea transgénica ensayada, indicando que la transgénesis no afectó la infección de CMV. Cuando se ensayó el virus mutante CMV Δ MP::erGFP no se observaron síntomas sistémicos en esta línea, indicando que la proteína MP^{CPsV} expresada *trans* y en forma constitutiva, no es capaz de

facilitar el transporte sistémico del genoma de CMV. Sin embargo, cuando estos mismos ensayos fueron realizados con la propia CP de CMV expresada de forma constitutiva en la planta, la cual es necesaria para el movimiento a larga distancia, el virus no fue movilizado, es decir, que no resultó suficiente para cumplir con esta función (S. H. Kim, M. Talianky y P. Palukaitis, datos no publicados). Esto puede deberse a los niveles de expresión de la proteína en estudio, por ejemplo, la cantidad de MP^{CPsV} en la línea *N. benthamiana* 54:06, ya sea en mesófilo como en los tejidos del floema, puede ser lo suficientemente baja para no resultar eficiente en la complementación del movimiento de este virus mutante. También resta por determinar si el movimiento célula a célula es complementado en esta línea, ya que de no hacerlo, no es un ensayo que deba repetirse.

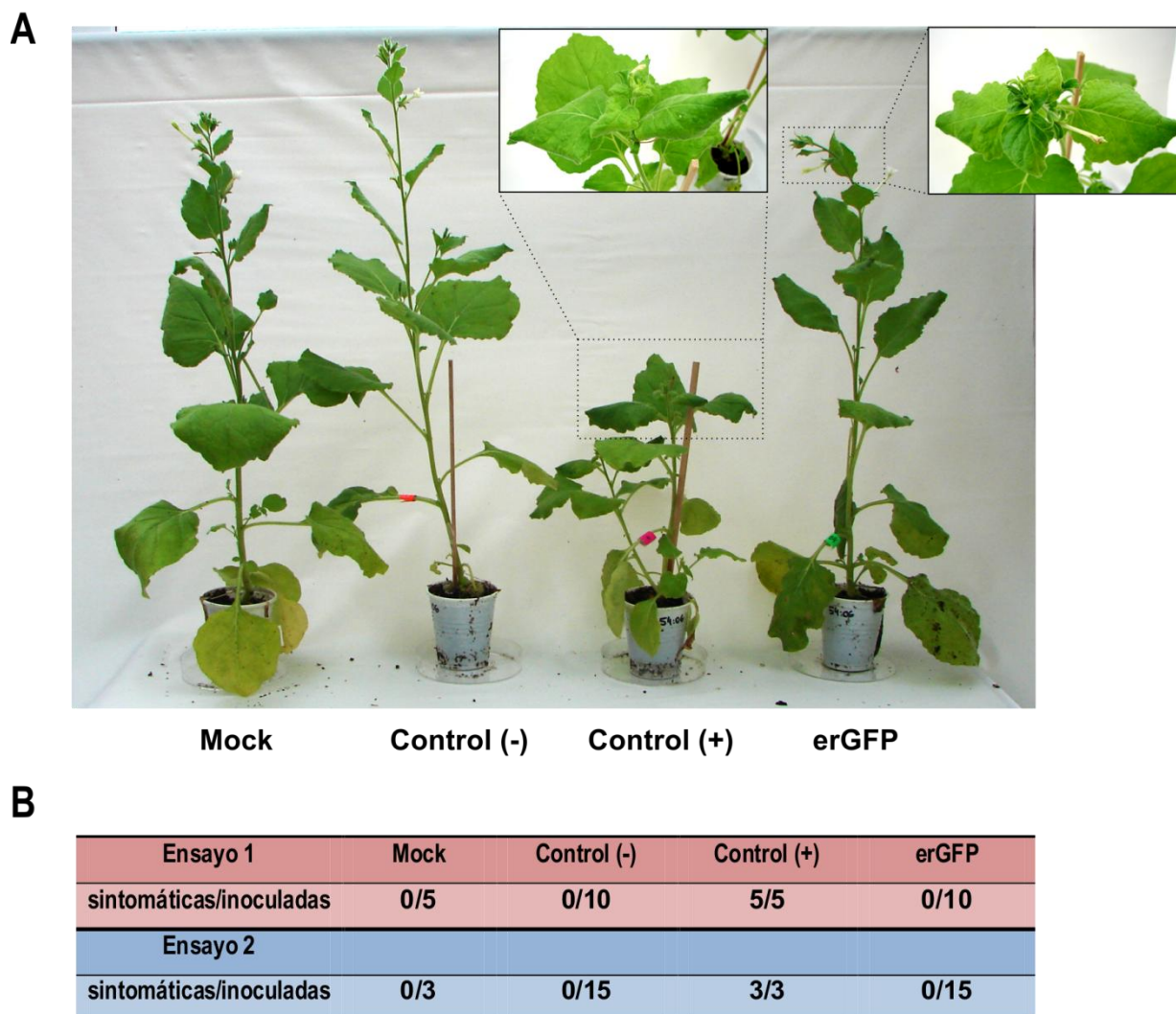


Figura 63. Ensayo de infección sistémica en la línea 54:06 de *N. benthamiana*. A) Plantas 54:06 representativas de un ensayo de movimiento sistémico a 25 dpai B) Resultados de dos ensayos independientes de movimiento a larga distancia. Sintomáticas/inoculadas=n° de plantas que mostraron síntomas sistémicos/n° de plantas inoculadas. Mock=plantas no agroinfiltradas

2.2. Estudio de la capacidad de un virus TMV Δ CP de infectar sistémicamente plantas de la línea 48:02 de *N. benthamiana*

Con el propósito de determinar si la proteína CP de CPsV podría estar involucrada en el movimiento viral a larga distancia, se realizó un ensayo similar al anterior pero utilizando un vector viral TMV Δ CP::GFP (Figura 64, panel A, pJL-TRBO-G, Lindbo, 2007) que expresa el genoma de TMV pero expresa la proteína GFP en reemplazo de su CP. Este vector puede movilizarse célula a célula pero no posee la capacidad de moverse a larga distancia. Así, se agroinfiltraron plantas de la línea 48:02 *N. benthamiana*, y a partir de los 5 dpai se comenzó a analizar la presencia de TMV en las hojas superiores: observación de síntomas típicos de TMV (mosaicos), y la presencia de GFP por iluminación con luz UV (Figura 64, panel B). Como control negativo se utilizaron plantas de *N. benthamiana* wt agroinfectadas con el virus TMV Δ CP::GFP y como control positivo plantas de la línea 48:02 agroinfectadas con el virus TMV::GFP (Figura 64, panel A, pJL 24, Lindbo, 2007).

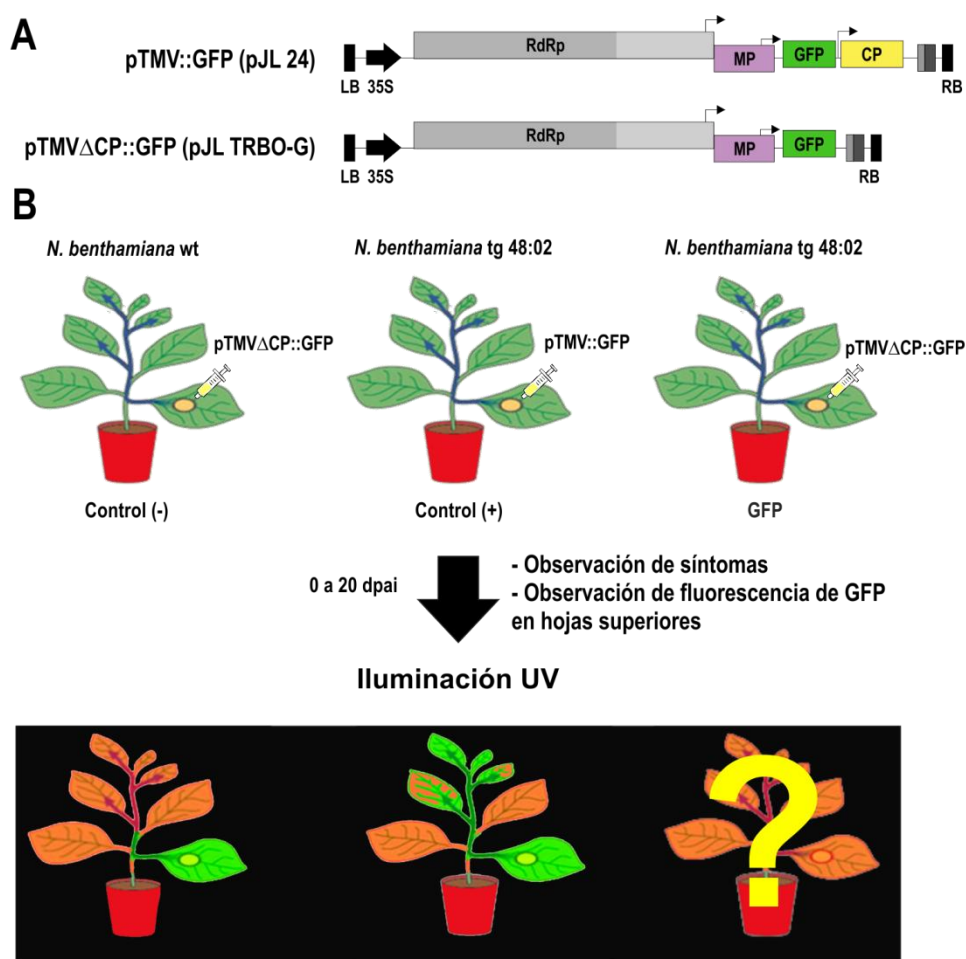


Figura 64. Diseño experimental de los ensayos de complementación del movimiento sistémico de TMV en plantas de la línea 48:02 de *N. benthamiana*. A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas. B) Esquema experimental.

En la Figura 65 se muestran los resultados obtenidos en dos experimentos independientes. Las plantas control (-) sólo mostraron expresión de GFP en la hoja inoculada, no mostrando ni síntomas ni expresión de GFP en hojas superiores luego de 20 dpai. Las plantas control (+) comenzaron a mostrar expresión de GFP en las hojas superiores a partir de los 5 dpai, manifestando síntomas claros de infección a partir de los 10 dpai. Cuando se analizaron las plantas de la línea 48:02 inoculadas con el virus mutante no se vieron síntomas sistémicos ni expresión de GFP en el tiempo del ensayo.

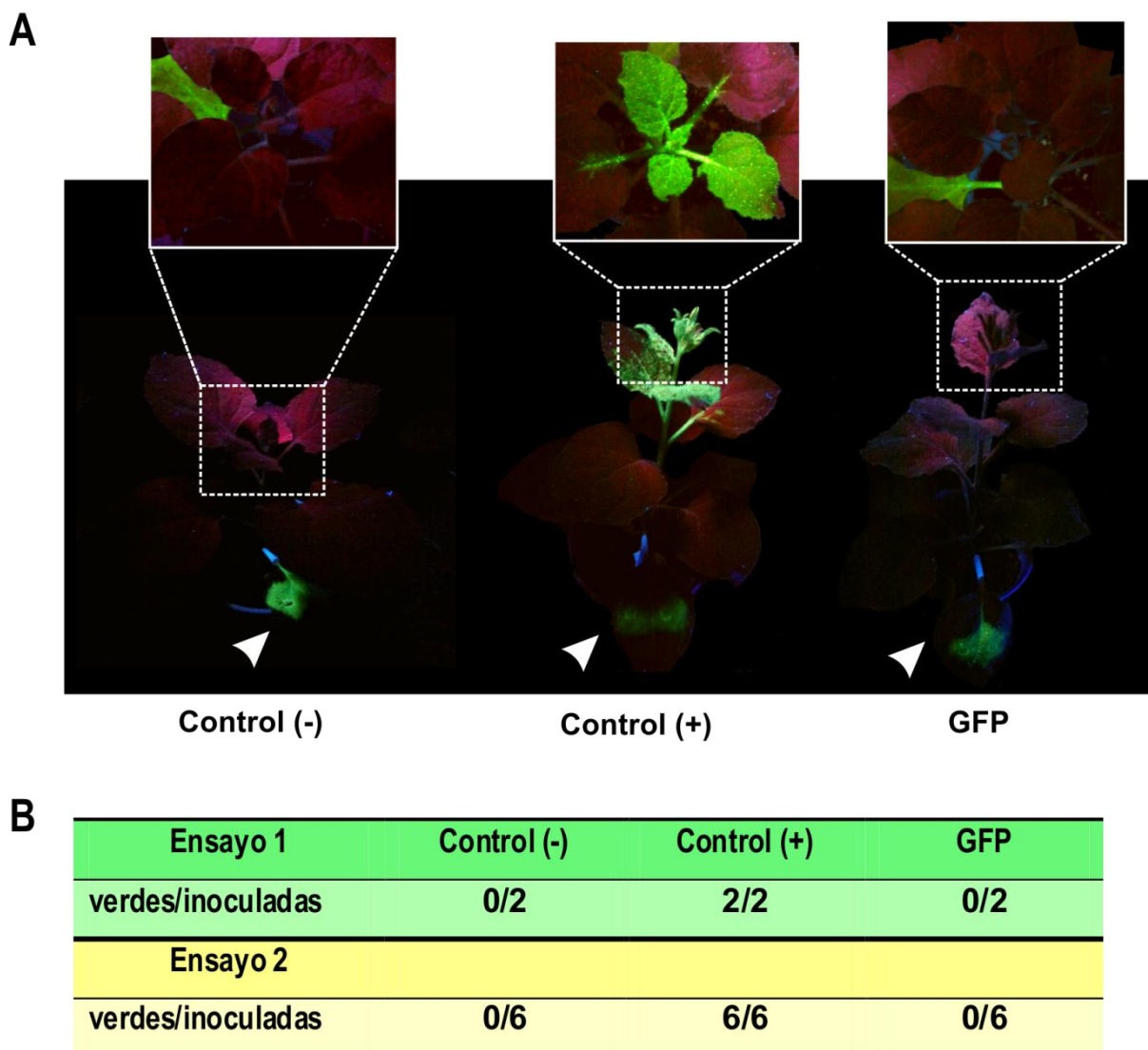


Figura 65. Ensayo de infección sistémica en líneas transgénicas 48:02 de *N. benthamiana*. A) Plantas de *N. benthamiana* tg 48:02 representativas de un ensayo de movimiento sistémico observadas bajo iluminación U.V. a 15 dpai. Las puntas de flecha blancas señalan las hojas inoculadas. B) Resultados de dos ensayos independientes de movimiento a larga distancia. Verdes/inoculadas=n° de plantas que mostraron fluorescencia verde/n° de plantas inoculadas.

Los resultados nos indican que la proteína CP^{CPsv} expresada en *trans* no es capaz de reemplazar funcionalmente a la CP^{TMV}, la cual es crítica para la propagación del virus por el

floema (Culver and Dawson, 1989; Ding et al., 1996; Holt and Beachy, 1991; Takamatsu et al., 1987). Este resultado negativo, sin embargo, no nos permite sacar conclusiones acerca del posible rol de la CP^{CPsV} en la infección sistémica de CPsV.

CONCLUSIONES

- El virus híbrido CMV-CPsV generado sería capaz de infectar plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt.
- La proteína MP de CPsV sería capaz de facilitar el movimiento a larga distancia del genoma CMV-CPsV en plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt.
- La proteína MP de CPsV no es capaz de complementar el transporte a larga distancia del genoma CMV Δ MP cuando es expresada en forma estable en plantas de la línea 54:06 de *N. benthamiana*.
- La proteína CP de CPsV no es capaz de complementar el transporte a larga distancia del genoma del virus TMV Δ CP cuando es expresada en forma estable en plantas de la línea 48:02 de *N. benthamiana*.

DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran las primeras evidencias en favor de la hipótesis de que el movimiento a larga distancia de los ophiovirus estaría dirigido por sus proteínas MP. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otras proteínas virales, incluyendo la CP, estén involucradas en esta función, ya que es la limitación de este tipo de ensayos.

La falta de clones infectivos de ophiovirus que permitan llevar a cabo experimentos de genética reversa, dificulta en gran medida el análisis funcional de las proteínas virales de estos virus, y en particular de los estudios del mecanismo de transporte sistémico. Como estrategia para sobrepasar este limitante, se generó un virus híbrido CMV-CPsV a partir del cual se analizó el rol de la MP de CPsV en el movimiento a larga distancia del RNA viral, sin afectar ni la activación ni la replicación del genoma de CMV, además de que la MP de CMV no es requerida para iniciar la infección ni para la replicación. La inoculación de plantas de *N. benthamiana* con el virus CMV-CPsV dio como resultado una infección sistémica de las plantas, observándose síntomas similares a los causados por CMV. Resultados similares se obtuvieron con plantas de *N. occidentalis*, sin embargo, debido a que CPsV es capaz de moverse sistémicamente en este hospedante, hubiéramos esperado resultados más marcados que los obtenidos en *N. benthamiana*. De todas formas, debemos tener en cuenta que faltan las confirmaciones correspondientes por RT-PCR, las cuales podrían dar resultados más concluyentes, ya que podría detectarse una carga viral que no se corresponda con el desarrollo de síntomas. Estos resultados, mostraron que CMV-CPsV es un sistema eficiente para estudiar el papel de la MP de CPsV en el movimiento a larga distancia y en la infección sistémica, mientras que las líneas transgénicas que expresan la proteína MP^{CPsV} o CP^{CPsV} no permitieron aportar una evidencia más a este interrogante.

En los últimos años se han hecho muchos esfuerzos por identificar y caracterizar los determinantes virales implicados en la invasión sistémica de las plantas. Actualmente se sabe que además de la CP, muchas otras proteínas virales no estructurales, como las MP y las VRS, están implicadas en el transporte del virus a larga distancia. Las plantas despliegan diferentes mecanismos para prevenir la infección sistémica de los virus, por lo que es muy probable que ciertas proteínas virales que facilitan el movimiento vascular también estén involucradas en suprimir la defensa antiviral desplegada por la planta, como el silenciamiento de RNA. En muchos virus, estas dos funciones son conferidas por la misma proteína viral. Debido a que se ha encontrado actividad supresora del silenciamiento génico tanto en la proteína MP^{CPsV} como en la proteína 24K de CPsV, ambas podrían estar involucradas en el mecanismo de movimiento a larga distancia de CPsV, aunque probablemente cumpliendo roles diferentes.

Considerando que en general el tráfico vascular está cuidadosamente regulado y que el núcleo forma una parte esencial de estos circuitos reguladores, es de esperar que los virus produzcan factores que se trasladen al núcleo de las células hospedantes y alteren el programa transcripcional en favor del tráfico sistémico. Así, es altamente probable que el paso por el núcleo tanto de la proteína MP^{CPsV} como de la proteína 24K sea parte de una etapa del ciclo viral imprescindible para asegurar el transporte sistémico del genoma de CPsV. Además, es también posible que la fase nuclear/nucleolar de estas proteínas esté involucrada en la formación de los complejos de VRN de transporte sistémico, como ocurre con la proteína ORF3 de GRV (Ryabov et al., 2004; Ryabov et al., 2001; Ryabov et al., 1999b; Taliansky et al., 2003).

.

PERSPECTIVAS

Con el objetivo de confirmar la presencia del virus híbrido CMV-CPsV en las hojas superiores de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt, se optimizarán las reacciones de RT-PCR probando distintas condiciones de reacción y distintos juegos de cebadores, incluyendo los de la CP de CMV. Así mismo, se podría confirmar la presencia de la MP^{CPsV} en las hojas superiores por ensayos de *western blot* que serán revelados con antisueros específicos contra la MP^{CPsV}. Debido a que los resultados obtenidos con *N. occidentalis* no fueron tan contundentes, se realizarán más ensayos con un número mayor de plantas y probando diferentes condiciones de infección, ya que la agroinfiltración en *N. occidentalis* no es igual de eficiente que en *N. benthamiana*. Para esto, una alternativa de infección es el uso de extractos crudos de plantas de *N. benthamiana* infectadas con las distintas variantes de CMV, los cuales serán utilizados para inocular mecánicamente plantas de *N. occidentalis*.

Para continuar caracterizando el movimiento sistémico de los ophiovirus, se generarán híbridos semejantes al estudiado en este capítulo pero entre CMV y otros ophiovirus. En primer lugar, se obtendrá la quimera pRNA3ΔMP::MP^{MiLBVV} y se estudiará la capacidad del híbrido CMV-MiLBVV de transportarse por floema de manera sistémica. Así mismo, se generarán híbridos TMV-CPsV y TMV-MiLBVV, donde se reemplazará el gen de la CP^{TMV} y de la 30K por el gen de la CP y MP, respectivamente, del ophiovirus correspondiente, observando la capacidad de la CP de estos ophiovirus de reemplazar funcionalmente a la de TMV.

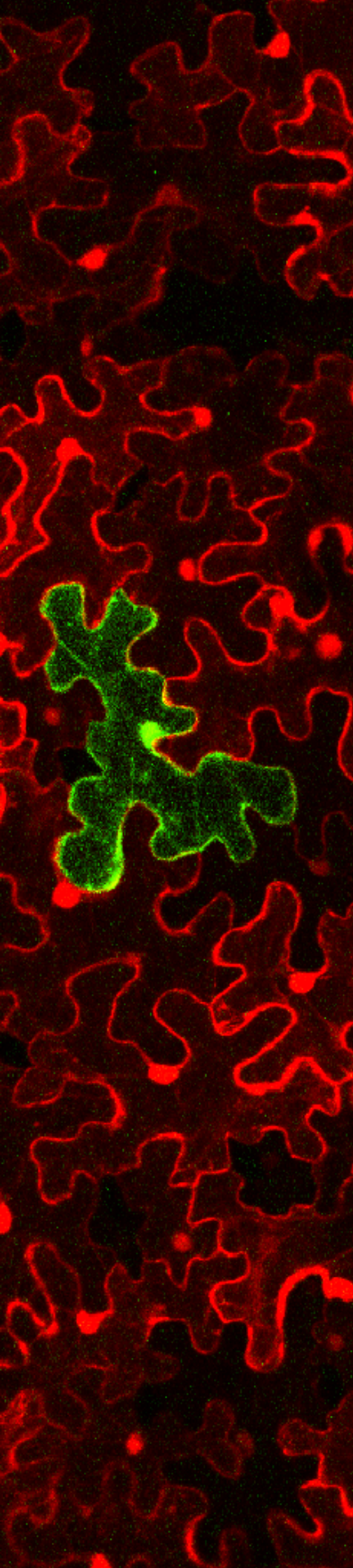
Debido a que las proteínas 24K de CPsV y 25K de MiLBVV se localizan en nucléolo y éste está fuertemente asociado con el transporte sistémico viral, y suponiendo que ambas proteínas son funcionalmente reemplazables entre sí, se estudiará la capacidad de 24K de facilitar el movimiento de los híbridos CMV-CPsV y CMV-MiLBVV en plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan la proteína 24K de CPsV. Como ocurre con la proteína ORF3 de CMV, es probable que las proteínas 24K y 25K reemplacen funcionalmente a la CP de TMV en la generación de complejos de RNP de transporte sistémico, por lo que se generarán virus híbridos TMVΔCP:24K y TMVΔCP:25K y se estudiará la capacidad de estos híbridos de moverse a hojas superiores no inoculadas.

Una desventaja que tiene el híbrido CMV-CPsV es que requiere de la transformación simultánea de células con las tres construcciones que permiten la expresión de los tres RNAs de CMV, lo cual limita el número de células en las hojas inoculadas que resultan infectadas por el virus. Un sistema muy eficiente para el estudio del mecanismo de transporte sistémico y que no lleva esa desventaja es el basado en el virus del mosaico de alfalfa, AMV, que fue utilizado por Leastro et al. (2017) para estudiar el movimiento a larga distancia de algunas especies del género *Tospovirus*. En este sistema se genera una quimera del cDNA del RNA3 de AMV donde

se reemplaza la MP^{AMV} por la proteína que se quiere estudiar. Una vez obtenida la quimera, se sintetizan transcritos de RNA *in vitro* a partir del cDNA híbrido y se inoculan plantas transgénicas de *Nicotiana tabaccum* que expresan las polimerasas P1 y P2 de AMV en todos los tejidos (Plantas P12, (van Dun et al., 1988)). Por lo tanto, emplear este sistema para el estudio del movimiento de los ophiovirus, nos puede brindar resultados más contundentes.

Debido a que el virus GRV no codifica para una CP convencional y por lo tanto no es requerida para su movimiento sistémico, sería muy interesante poder establecer un sistema basado en este virus para estudiar el mecanismo de transporte sistémico de los ophiovirus. El ORF3 de CMV es el factor viral encargado de reclutar la proteína nucleolar fibrilarina al citoplasma para formar los complejos de RNP necesarios para el transporte por floema. Las proteínas MP^{CPsV} y 24K que al igual que el ORF3 de CMV tienen una etapa nuclear/nucleolar, podrían reemplazar las funciones del ORF3, aportando un gran avance en el esclarecimiento del mecanismo utilizado por los ophiovirus. Otro punto a abordar es la posible interacción proteína-proteína entre fibrilarina y 24K y fibrilarina y MP^{CPsV} tanto *in vivo* como *in vitro*.

Finalmente, el desarrollo de un clon infectivo de ophiovirus, sería un aporte fundamental para comprender las distintas funciones de los genes, el ciclo viral de los ophiovirus en general, y el mecanismo de transporte sistémico en particular.



CAPÍTULO 5

Análisis del interactoma de la
proteína de movimiento de CPsV
en *N. benthamiana*

INTRODUCCIÓN

1. Factores celulares involucrados en la infección viral

Debido a la gran amenaza que representan los virus de plantas para los cultivos, comprender a fondo los mecanismos que tienen lugar durante la interacción entre la planta hospedante y el virus, es crucial para diseñar nuevas estrategias de resistencia que minimicen las pérdidas ocasionadas.

Las interacciones planta-virus revelan un contexto fisiopatológico muy complejo. Si bien los virus codifican sólo unas pocas proteínas, cuando infectan producen cambios significativos en los perfiles de expresión de sus hospedantes (Ahlquist et al., 2003; Hyodo and Okuno, 2014; Whitham and Wang, 2004). Además, interaccionan con diferentes conjuntos de factores del hospedante que interfieren con una amplia gama de procesos, tales como la regulación hormonal, el control del ciclo celular, la señalización y el transporte endógeno de macromoléculas (Panavas et al., 2005). Como ejemplo, el dominio helicasa de la replicasa de TMV interacciona con un regulador putativo de los genes de respuesta a auxinas implicados en el desarrollo de la planta, la proteína PAP1 (*phytochrome-associated protein 1*) de *A. thaliana*. Esta interacción interfiere con el sistema de respuesta a auxinas y con la vía de señalización, induciendo síntomas específicos de la enfermedad (Padmanabhan et al., 2005). Una etapa crucial en el ciclo viral es la capacidad activa para moverse entre las células del hospedante, que como hemos mencionado previamente, está mediada por las MPs, las cuales forman complejos de ribonucleoproteínas con el genoma viral o forman estructuras tubulares que contienen viriones para permitir el paso del virus a través de los PDs (Laporte et al., 2003; Lazarowitz and Beachy, 1999; Pallas and Garcia, 2011; Wolf et al., 1989). Estas MPs interaccionan con un gran número de proteínas vegetales localizadas en diferentes compartimientos celulares (núcleo, citoplasma, ER, membrana plasmática) que son fundamentales para el movimiento y desarrollo de síntomas.

2. Proteínas del hospedante que interaccionan con las MP virales

Como sabemos, las MPs virales son proteínas multifuncionales involucradas en muchas facetas de la infección viral, incluyendo la formación de complejos de vRNP, el tráfico célula a célula y larga distancia del genoma viral, la traducción del RNA viral y la supresión del silenciamiento génico (Harrison and Robinson, 2005; Kasschau and Carrington, 1998). Para ejecutar estas funciones, las MP deben ser capaces de interaccionar con un grupo muy diverso de proteínas endógenas.

Se han descrito muchos ejemplos de interacciones entre proteínas de movimiento de la superfamilia 30K y proteínas de la planta, algunas de las cuales tienen una importancia funcional potencial (Amari et al., 2011; Kasteel et al., 1996; Liu et al., 2011; Niehl et al., 2012; Peiro et al., 2014). La gran mayoría de estas proteínas celulares se han identificado en sistemas heterólogos tales como ensayos de doble híbrido de levaduras, pero no a partir de los complejos purificados de proteínas nativas. Por ejemplo, se ha demostrado que la MP^{TMV} interacciona con factores del hospedante muy diversos, incluyendo elementos del citoesqueleto, calreticulina, pectin-metilesterasas y chaperones. Estas interacciones parecen participar en el anclaje de la MP^{TMV} en los PDs (Chen et al., 2000; Heinlein et al., 1995; McLean et al., 1995); (Chen et al., 2005; Dorokhov et al., 1999; Shimizu et al., 2009; von Bargen et al., 2001).

Así mismo, varios estudios se han centrado en la interacción entre las MPs virales y proteínas vegetales en un intento por identificar los factores del hospedante que están implicados en el tráfico de complejos macromoleculares (MCs) a los PDs.

En la siguiente tabla se resumen los datos de algunas proteínas de la planta que interaccionan con MPs virales.

Virus	Factor celular	Función celular/Proceso biológico	Referencias
Chaperonas			
TSWV	DNAJ-like	Chaperona (regulador de HSP70)	Soellick et al. (2000), von Bargen et al. (2001)
PMTV	DNAJ-like	Chaperona	Haupt et al. (2005)
TMV	NtMIP1	Chaperona DNAJ-like	Shimizu et al. (2009)
	CDC48	Chaperona. Control del movimiento viral	Niehl et al. (2012)
PVY	NtCPIP	Chaperona DNAJ-like. Reclutamiento de HSF70	Hofius et al. (2007)
AbMV	cpHSC70-1	Chaperona	Krenz et al. (2010)
Núcleo			
ToMV	KELP	Co-activador transcripcional de proteínas asociadas con la patogénesis	Matsushita et al. (2001)
TBSV	MBF1	Co-activador transcripcional	Matsushita et al. (2002)
	HFi22	Proteína homeodominio (<i>leucine zipper</i>)	Desvoyes et al. (2002)
	REF	Co-activador transcripcional, factor de exportación de RNA	Uhrig et al. (2004)
GRV	Fibrilarina	Formación de complejos de transporte sistémico	Kim et al. (2007), Canetta et al. (2008), Ryabov et al. (1999)
CaLCuV, TGMV, TCrLYV	NIG	GTPasa	Carvalho et al. (2008)
Citoesqueleto			
TMV	Actina	Movimiento del RNA viral	McLean y Zambryski (2000)
	Tubulina	Movimiento y degradación del RNA viral	Boyko et al. (2000), Gillespie et al. (2002), Sambade et al. (2008)
	EB1	Asociación de la MP con los MTs	Brandner et al. (2008)
	MPB2C	Regulador negativo de la función de la MP	Kragler et al. (2003)
TSWV	At4/1	Homología con las miosinas y kinesinas	von Bargen et al. (2001)

CMV	Actina	Incremento del SEL de los PD, cortado de actina	Su et al. (2010)
Cloroplastos			
AltMV	Membrana del cloroplasto	Movimiento célula a célula y larga distancia.	Lim et al. (2010)
	β ATPasa	Sintomatología	
	PsbO	Respuesta de defensa	Seo et al. (2014)
		Desarrollo de síntomas	Jang et al. (2013)
OYDV	RbCL, RbCS	Fotosíntesis	Lin et al. (2011)
SMV	RbCL, RbCS	Fotosíntesis	Lin et al. (2011)
SYSV	RbCL, RbCS	Afecta la función de la RubisCO	Lin et al. (2011)
TuMV	RbCL, RbCS	Fotosíntesis	Lin et al. (2011)
RCNMV	GAPDH-A	Movimiento célula a célula	Kaido et al. (2014)
TMV	RbCS	Movimiento célula a célula	Zhao et al. (2013)
ToMV	RbCS	Movimiento célula a célula	Zhao et al. (2013)
AbMV	cpHSC70-1	Movimiento célula a célula	Krenz et al. (2010), (2012)
CaMV	CHUP1	Movimiento célula a célula	Angel et al. (2013), Harries et al. (2009)
Tráfico de vesículas			
GFLV	KNOLLE	t-SNARE (syntaxina)	Laporte et al. (2003)
CaMV	MP17	Receptor Rab	Boyko et al. (2000), Huang et al. (2001)
TMV	SYTA	Regulador de endocitosis vesicular	Lewis and Lazarowitz (2010)
CaLCuV	SYTA	Regulador de endocitosis vesicular	Lewis and Lazarowitz (2010), Uchiyama et al. (2014)
TVCV	SYTA	Formación de contactos entre ER-PM.	Levy et al. (2015), Uchiyama et al. (2014)
TuMV	SYTA	Regulador del movimiento viral intercelular	Uchiyama et al. (2014)
PDs y periferia celular			
TMV	PME	Interacción MP-PD (esterificación de pectina)	Chen et al. (2000), Dorokhov et al. (1999), Chen y Citovsky (2003)
	PAPK1	Kinasa reguladora del tráfico macromolecular	Lee et al. (2005)
	Calreticulin	Movimiento de vRNP	Chen et al. (2005)
TLCV	SIUPTG1	Biosíntesis de polisacáridos de pared	Selth et al. (2006)
GFLV	PDLPS	Biogénesis de túbulos en los PDs y movimiento viral	Amari et al. (2010)
TVCV	PME	Interacción MP-PD	Chen et al. (2000),
CaMV	PME	Interacción MP-PD	Chen et al. (2000),
	PDLP1	Formación de túbulos de MP	Rodriguez et al. (2014)
TCV	AtP8	Desconocida (contiene motivos RGD)	Lin y Heaton (2001)
AMV	PATL 3 y 6	Tráfico de membranas y dinámica del citoesqueleto	Peiró et al. (2014)
PVX	TIPs	Interacción con β -1,3-glucanasas	Fridborg et al. (2003)
	REM	Impide el incremento del SEL de los PDs	Raffaele et al. (2009)
Otras			
CMV	2bip	Desconocida	Ham et al. (1999)
	CsAO4	Ascorbato oxidasa. Movimiento viral	Kumari et al. (2016)
ToMV	IP-L	Interacting protein L. Movimiento sistémico	Li et al. (2005)
PSbMV	PVIP	Requerida para el movimiento viral. Dominio PHD <i>finger</i>	Dunoyer et al. (2004)
Potyvirus	eIF4E	Factor de iniciación de la traducción. Movimiento viral	Leonard et al. (2000, 2004), Robaglia y Caranta (2006), Schaad et al. (2000), Wittmann et al. (1997)
CaLCuV	AtNSI	Acetiltransferasa, facilita el transporte del genoma viral.	McGarry et al. (2003), Carvalho et al. (2006)

PPV	PSI-K	Componente del fotosistema I. Inhibición de la infección	Jimenez et al. (2006)
CaMV	AtSRC2.2	C2-Calcium-Dependent Membrane-Targeting Protein	Rodriguez et al. (2014)

Tabla 2. Proteínas de la planta que interaccionan con MPs de diferentes virus. Se describe la función biológica putativa de cada interacción o en los casos q se desconoce, se describe el proceso celular en que está involucrada la proteína del hospedante. TSWV=Tomato spotted wilt virus, PMTV=Potato mop-top virus, TMV=Tobacco mosaic virus, PVY=Potato virus Y, AbMV=Abutilon mosaic virus, ToMV=Tomato mosaic virus, TBSV=Tomato bushy stunt virus, CaLCuV=Cabbage leaf curl virus, TGMV=Tomato golden mosaic virus, TCrLYV=Tomato crinkle leaf yellows virus, GRV=Groundnut rosette virus, AltMV=Alternanthera mosaic virus, OYDV=Onion yellow dwarf virus, SMV=Soybean mosaic virus, SYSV=Shallot yellow stripe virus, TuMV=Turnip mosaic virus, RCNMV=Red clover necrotic mosaic virus, CaMV=Cauliflower mosaic virus, TLCV=Tobacco leaf curl virus, GFLV=Grapevine fanleaf virus, TVCV=Turnip vein clearing virus, TCV= Turnip crinkle virus, AMV=Alfalfa mosaic virus, PVX=Potato virus X, PSbMV=Pea seed-borne mosaic virus, PPV=Plum pox virus. Revisión realizada en este trabajo de tesis doctoral.

Como se muestra, las proteínas vegetales que interaccionan con MPs virales identificadas hasta el momento, pueden agruparse en las siguientes categorías:

2.1 Chaperonas

Se ha demostrado que varias MP virales interaccionan con chaperonas de tipo DnaJ, un grupo de proteínas pequeñas pertenecientes a la subclase Hsp40. Estas proteínas participan en varios procesos, incluyendo la importación de proteínas en orgánulos y la regulación de la actividad chaperona de Hsp70 (Kelley, 1999). Las chaperonas de tipo Hsp podrían desempeñar un papel en el desplegado parcial de las proteínas antes de su translocación a través del poro del PD (Jackson, 2000). En el caso de las chaperonas de la familia Hsp70, además de estar involucradas en muchos procesos celulares (Mayer and Bukau, 2005), los virus pueden utilizarlas para el plegamiento de proteínas (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002), para el ensamblaje de viriones (Alzhanova et al., 2001; Napuli et al., 2000; Satyanarayana et al., 2000), y tal vez también para la regulación de las defensas del hospedante de manera directa o indirecta por interacción con las cochaperonas de dominio-J (principalmente Hsp40 en eucariotas) (Kanzaki et al., 2003). Se encontró que chaperonas Hsp/c70 aisladas de fracciones de pared ricas en PDs y de exudados de floema de *Cucurbita*, interaccionan con los PDs y modifican su SEL. Este hallazgo junto con el hecho de que las Hsp70 tienen actividades motoras que impulsan la translocación de proteínas (Pilon and Schekman, 1999; Voisine et al., 1999) sugiere que las proteínas Hsp70 pueden tener la capacidad de translocar activamente MC virales a través de los poros del PD. Curiosamente, se encontró que una proteína Hsp70 citosólica (no floemática) no posee el motivo necesario para modificar el SEL, lo que indica que la Hsp70 identificada en el floema podría tener un papel crucial en el movimiento de los MCs dentro o fuera del floema. Los closterovirus son el único grupo de virus conocido que codifica sus homólogos de Hsp70, y estas proteínas han

demostrado ser MPs (Alzhanova et al., 2001; Peremyslov et al., 1999). También se ha demostrado que MPs de virus no relacionados con los closterovirus interaccionan con proteínas de dominio-J (Soellick et al., 2000; von Bargen et al., 2001), por lo que resulta altamente probable que algunos virus hayan desarrollado la capacidad de reclutar chaperonas del hospedante durante el proceso de infección para promover su movimiento intercelular (Oparka, 2004).

Muchas proteínas asociadas a chaperonas se unen directamente a un motor molecular, garantizando la llegada de los MCs al citoesqueleto. Se ha demostrado que varios motores moleculares, incluidas las miosinas, kinesinas y dineínas, interaccionan con proteínas celulares que determinan especificidad de transporte (Karcher et al., 2002). La doble función de las GTPasas Rab, es decir, su especificidad por sus *cargo* y su capacidad para vincular estos *cargo* con el citoesqueleto, hace que sean buenas candidatas para mediar el tráfico de MC virales (Long et al., 2000; Tekotte and Davis, 2002).

Niehl et al. (2012) encontraron que la chaperona CDC48 (CELL-DIVISIONCYCLE protein 48) actúa regulando los patrones de acumulación de MP^{TMV} en las células de la planta. Demostraron que la CDC48 de *Arabidopsis* es inducida durante la infección por TMV, interacciona con la MP^{TMV} en inclusiones de ER, y promueve su degradación. Además, mostraron evidencias de que CDC48 extrae la MP de las inclusiones de ER hacia el citosol, donde se acumula en microtúbulos y los estabiliza en las etapas tardías de infección. La sobreexpresión de CDC48 afecta el movimiento del virus, lo que sugiere que CDC48 controla el movimiento del virus mediante la eliminación de la MP de la vía de transporte por ER, y promueve la interferencia de la MP con la dinámica de microtúbulos para impedir su movimiento (Niehl et al., 2012).

2.2. Proteínas nucleares

Por estudios de interacción proteína-proteína se ha encontrado que algunas MP virales interaccionan con componentes nucleares (Tabla 2). En particular, con factores de transcripción sugiriendo un mecanismo por el cual las MPs podrían lograr el transporte selectivo a través de los PDs, reclutando proteínas del hospedante con capacidad para moverse a sí mismas a través de los PDs. Por ejemplo, la MP de TBSV (la proteína P22), interacciona con el factor de transcripción HFi22, lo que podría permitir el transporte de complejos P22-RNA a través de los PDs (Desvoves et al., 2002). Además, esta interacción también podría estar impidiendo que el factor de transcripción active la expresión de genes de defensa, lo que concuerda con la hipótesis de que algunas MP virales interaccionan con proteínas co-activadoras transcripcionales para alterar la expresión génica (Desvoves et al., 2002; Matsushita et al.,

2001). Estos datos sugieren que al menos algunas MPs virales deben interactuar con determinadas proteínas nucleares para mediar el movimiento célula a célula del virus.

La proteína ORF3 de GRV juega un papel esencial en el movimiento a larga distancia del RNA viral (Ryabov et al., 1999b). Al entrar en el núcleo, la proteína ORF3 interactúa y reorganiza los *Cajal bodies* (CBs) que luego se fusionan con el nucléolo. En una etapa posterior, provoca la redistribución de la fibrilarina desde el núcleo hasta el citoplasma, condición necesaria para el movimiento a larga distancia (Kim et al., 2007b). Estos hallazgos condujeron a un modelo en el que la proteína ORF3 interactúa con fibrilarina en el núcleo, entra en el nucléolo a través de la fusión de CBs mediada por fibrilarina, y luego sale del núcleo hacia el citoplasma donde forma partículas de RNP virales para el movimiento a larga distancia (Kim et al., 2007a; Kim et al., 2007b).

2.3. Proteínas asociadas al citoesqueleto

La MP de TMV interactúa con varios componentes del citoesqueleto, como la proteína asociada a microtúbulos MPB2C (Kragler et al., 2003), la proteína EB1 (*microtubule end-binding protein 1*) (Brandner et al., 2008) y los filamentos de actina (McLean and Zambryski, 2000). También se ha demostrado que otras MPs virales interactúan con elementos del citoesqueleto (Tabla 2), indicando la ruta por la cual los complejos vRNP alcanzan los PDs. Además, hay estudios que sugieren que los microtúbulos podrían transportar la MP de TMV como parte de un mecanismo de degradación de proteínas (Gillespie et al., 2002). También se ha encontrado una asociación directa entre algunas MPs virales y proteínas similares a miosinas o kinesinas (von Bargen et al., 2001), lo que sugiere que el sistema actina-miosina podría ser utilizado por los virus para dirigirse al PD.

En el modelo estructural propuesto por Overall y Blackman (1996), la actina se representa atravesando el poro del PD, estrechamente asociado con el desmotúbulo central (ver Figura 11, Introducción General) (Overall and Blackman, 1996). También se muestran miosinas dispuestas de manera radial sobre la actina, físicamente vinculada a la membrana plasmática. Esta disposición estructural podría crear tensión entre la membrana plasmática y el desmotúbulo, regulando la apertura de los poros. Se sabe que la miosina interviene en la generación de tensión entre membranas adyacentes de células de mamíferos (Kussel-Andermann et al., 2000). La miosina VIII de plantas se ha encontrado localizada en los PDs (Reichelt et al., 1999), donde además cumple un rol en la regulación de su función (Baluska et al., 2001; Baluska et al., 2000). Esta miosina podría estar unida a la membrana plasmática dentro de los PD, posiblemente por su región globular C-terminal (Baluska et al., 2001). La miosina VIII también tiene una región característica de dominio motor, común a todas las miosinas, así como cuatro motivos IQ que se prevé que se unan a calmodulina (Baluska et al.,

2001). Por lo tanto, es posible que la miosina VIII funcione como un motor molecular regulado por Ca^{2+} que sea capaz de transportar *cargos* a lo largo de los filamentos de actina que atraviesan el poro del PD.

2.4. Proteínas de cloroplastos

Está reportado que determinadas proteínas de cloroplasto ayudan a los virus a cumplir su ciclo infectivo en las plantas. Según estudios recientes, los virus de plantas han evolucionado para utilizar un gran número de proteínas de cloroplasto para regular su movimiento. Dependiendo del lugar donde se encuentre la proteína cloroplástica dentro de la célula, estas interacciones pueden tener lugar en la luz del tilacoide, en la membrana del tilacoide, en el estroma, en la membrana del cloroplasto o en el citosol. En el capítulo 2 se detallaron varias de las asociaciones reportadas entre proteínas de cloroplasto con MPs virales. Otros ejemplos incluyen la MP de RCNMV, que interacciona con la subunidad A de la proteína cloroplástica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH-A) (Tabla 2). El silenciamiento del gen *GAPDH-A* inhibe la localización de MP en los VRCs corticales y reduce la multiplicación de RCNMV en las hojas inoculadas, pero no en las células individuales, lo que sugiere que GAPDH-A desempeña un papel positivo en el movimiento célula a célula de RCNMV (Kaido et al., 2014). Se ha propuesto que GAPDH-A se translocaría desde cloroplasto a los VRC corticales para facilitar el movimiento célula a célula durante la infección por RCNMV (Zhao et al., 2016).

La asociación entre los virus y cloroplastos también es importante para la infección sistémica. En ausencia de transporte mediado por vesículas, los ácidos nucleicos virales se asocian con proteínas virales y del hospedante para moverse dentro de la célula. Al carecer de maquinaria de silenciamiento génico, los cloroplastos pueden servir como compartimento seguro y proteger el genoma viral de las moléculas de defensa del hospedante. La MP de AbMV interacciona con la proteína de cloroplastos cpHSP70 codificada en el núcleo, e induce la formación de una red tubular de estrómulos que contiene cpHSP (Krenz et al., 2012; Krenz et al., 2010). Se cree que tales estructuras pueden crear canales que ayudarían en el movimiento local y sistémico de los virus (Bhattacharyya and Chakraborty, 2017).

CHUP1 (*Chloroplast Unusual Positioning 1*) es una proteína de la planta que se localiza en la membrana externa de los cloroplastos y está involucrada en el transporte de estas organelas a lo largo de los microfilamentos de actina (Oikawa et al., 2003). Se ha reportado que la interacción de la proteína P6 de CaMV con CHUP1 ayuda a que los cuerpos de inclusión móviles de P6 se muevan dentro de la célula a lo largo de los microfilamentos de actina para alcanzar los PDs (Harries et al., 2009a). Esta interacción influye en la acumulación viral y en el

movimiento célula a célula y larga distancia tanto del virus como de la respuesta antiviral de la planta (Angel et al., 2013).

Está bien reportado que existen interacciones entre MPs virales y proteínas de los cloroplastos relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos, como el caso de la proteína TGB1L88 de AltMV, la cual interacciona con la β ATPasa del cloroplasto y desencadena una respuesta antiviral (Seo et al., 2014).

2.5. Proteínas de tráfico vesicular

2.5.1. Rabs

Dentro del grupo de proteínas reguladoras del transporte de vesículas, las Rab GTPasas determinan los eventos clave de fusión de membranas (Nebenfuhr, 2002; Rutherford and Moore, 2002). En el caso de los virus de plantas, uno de los medios para lograr el transporte selectivo a los PDs sería acoplándose a alguna proteína Rab que se está desplazando a la ubicación subcelular correcta, ya sea por interacción directa con la Rab o por unión a una *carga* vesicular que está siendo dirigido al PD por una Rab determinada.

2.5.2. KNOLLE

La proteína KNOLLE es una syntaxina específica de la citocinesis (Lauber et al., 1997). Durante la formación del fragmoplasto, las vesículas derivadas de Golgi se dirigen al plano ecuatorial, donde se fusionan para formar una red de membrana en forma de disco, conocida como placa celular (Verma, 2001). Por estudios de co-inmunoprecipitación se encontró que la MP de GFLV interacciona con KNOLLE, ambas proteínas a su vez co-localizan en la placa celular en desarrollo (Laporte et al., 2003). Los mismos autores propusieron un modelo en el cual la MP de GFLV se transporta a sitios específicos en la célula, posiblemente por co-empaquetado con KNOLLE en las mismas vesículas derivadas de Golgi. De esta manera, las proteínas mediadoras del tráfico y fusión vesicular, como las Rabs y SNARE, serían posibles blancos utilizados por las MPs virales para dirigir el genoma viral al PD.

2.5.3. SYTA

Las sinaptotagminas (Syts) son sensores de calcio que regulan la exo/endocitosis de vesícula sinápticas en animales y también han sido caracterizadas en plantas (Craxton, 2004, 2007). Se ha demostrado que la sinaptotagmina SYTA de *Arabidopsis* regula el reciclaje de endosomas y el movimiento viral a través de los PDs (Lewis y Lazarowitz, 2010). SYTA se localiza en los endosomas de las células vegetales y se une directamente a las MP de CaLCuV y TMV, sugiriendo que distintas MPs virales transportan sus *cargos* a los PDs a través de una vía endocítica de reciclaje (Lewis y Lazarowitz, 2010).

Se ha demostrado que durante la infección por TVCV, su MP recluta proteínas SYTA a los PDs, y posteriormente SYTA junto con el ER cortical forman sitios de replicación viral adyacentes a los PDs, en los que MP^{TVCV} y SYTA interaccionan directamente dentro de membranas de ER. Estos hallazgos muestran que SYTA es esencial para formar sitios de contacto ER-membrana plasmática (ER-PM), y sugieren que algunas MPs interaccionan con SYTA para reclutar estos sitios y alterar los PDs para el movimiento célula a célula del virus (Levy et al., 2015).

2.6. Proteínas asociadas a los PDs

2.6.1. Pectin metil esterasas

Se ha demostrado que tanto la MP de TMV como otras MPs virales, interaccionan con pectin metil esterasas (PME) (Chen et al., 2000; Dorokhov et al., 1999), un grupo de enzimas hidrolasas que interviene en la modificación de las regiones de la pared celular que son ricas en pectina. La supresión de la expresión de PME en tabaco conduce al retraso del movimiento sistémico de TMV (Chen and Citovsky, 2003).

Posiblemente, estas MPs sólo interaccionen con las PME una vez que han sido transportadas al PD (Morozov and Solovyev, 2003). Sin embargo, otra posibilidad es que esta interacción se dé antes de la llegada a la membrana plasmática (Jackson, 2000). Desde este punto de vista, las PME podrían funcionar como *cargo* en lugar de como receptores de MP en los PDs.

2.6.2. Proteínas que interaccionan con TGB 12K

Para el movimiento célula a célula de PVX se requiere de los productos génicos del *triple-gene block* (TGB) junto con la proteína de la cápside viral (Morozov y Solovyev, 2003). Usando la proteína de 12 kDa (12K) del TGB, que es la encargada de aumentar el SEL de los PD (Tamai and Meshi, 2001), como cebo en un ensayo de doble híbrido de levaduras, se lograron identificar tres proteínas celulares que interaccionan con TGB12K, denominadas TIP (TGB12K *Interacting Proteins*) (Fridborg et al., 2003). Estas tres TIPs, a su vez interaccionan con β -1,3-glucanasas, apoyando la idea de que la regulación de la actividad β -1,3-glucanasa por parte de las MPs virales, podría ser un medio por el cual algunos virus manipulan la deposición de calosa en el cuello del PD en favor de la infección (Iglesias y Meins, 2000).

2.6.3. PDLPs

Las PDLPs (PD-located proteins) conforman una familia de proteínas de membrana de tipo-I que se localizan específicamente en los PDs, y constan de un dominio receptor apoplástico, un dominio transmembrana y una cola C-terminal citoplasmática con baja conservación de secuencia. Se ha demostrado que estas proteínas se transportan por la vía secretora para llegar a los PD, más específicamente a la membrana plasmática que recubre el interior del poro

(Thomas et al., 2008). Se encontró que las proteínas PDLIP interaccionan únicamente con las MPs virales que forman estructuras tubulares en los PDs, y promueven el movimiento célula a célula de estos virus (Amari et al., 2010).

2.6.4. PAPK

Se determinó que la proteína quinasa PAPK (de *Nicotiana tabacum*) asociada al PD, exhibe actividad quinasa independiente del calcio y muestra especificidad de sustrato al reconocer NCAPs virales y endógenas (Lee et al., 2005). Esta PAPK fosforila específicamente los residuos C-terminales de la MP de TMV y se ha demostrado que esta modificación postraduccional afecta su función. Por estudios de localización subcelular se identificó un posible homólogo de PAPK de *Arabidopsis thaliana*, PAPK1, que colocaliza con MP^{TMV} dentro de los PDs. De esta forma, PAPK1 representa una proteína quinasa vegetal que se dirige a los PDs y puede desempeñar un papel regulador en el tráfico macromolecular (Lee et al., 2005).

3. Técnicas de proteómica aplicadas a la identificación de proteínas celulares que participan de la interacción planta-virus

Hasta el momento, los estudios de genómica funcional realizados durante la interacción planta-virus se han limitado principalmente al análisis del transcriptoma. Recientemente se ha comenzado a aplicar enfoques proteómicos, los cuales están permitiendo dar grandes pasos en este área de investigación. Se han identificado muchos factores celulares que interaccionan con RNAs y proteínas virales mediante ensayos de doble híbrido (Y2H), complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC), co-inmunoprecipitación (Co-IP) y diferentes técnicas de proteómica (Choi et al., 2016). Dentro de las últimas, la electroforesis bidimensional clásica acoplada a la espectrometría de masas (MS) ha sido durante muchos años la plataforma más utilizada en el análisis de proteomas de plantas. Se pueden utilizar diferentes enfoques proteómicos para estudiar de forma cuali y cuantitativa los factores celulares que participan durante las infecciones virales (Afroz et al., 2011; Mehta et al., 2008). Este tipo de análisis requiere plataformas proteómicas sensibles que permitan la determinación cuantitativa de proteínas en muestras biológicas complejas. Recientemente, la aplicación de técnicas proteómicas cuantitativas de segunda generación, principalmente las técnicas de identificación de proteínas libres de gel, como el “*shotgun*”, están surgiendo como enfoques analíticos mucho más potentes. Este enfoque permite la separación directa, cuantificación e identificación de proteínas en una mezcla compleja, basándose en la suposición de que las intensidades de los picos registradas en un espectro de masas son directamente proporcionales a las concentraciones de iones en la muestra (péptidos analizados). La técnica *multidimensional protein identification technology* (MudPIT) consiste en la separación de péptidos por

cromatografía líquida (LC) acoplada directamente a un espectrómetro de masas (Washburn et al., 2001). La principal desventaja de esta tecnología es la gran variación entre experimentos, debido a que se realiza un análisis comparativo entre dos muestras comparando intensidades de picos de dos espectros de masas diferentes. Con el fin de minimizar esta variación entre muestras, las proteínas extraídas pueden marcarse diferencialmente con secuencias cortas conteniendo isótopos estables de carbono o nitrógeno. De este modo, se pueden analizar de manera simultánea diferentes muestras y los mismos péptidos aparecerán como dobletes en el espectro de masas. En el caso de ICAT (*Isotope-coded affinity tag*), las proteínas de dos muestras se marcan en residuos de cisteína usando isótopos estables livianos o pesados. Los péptidos derivados se separan simultáneamente por LC y se analizan cuantitativamente por MS en tándem (MSMS) (Jorin et al., 2007).

En el desarrollo de esta tesis, utilizamos ensayos de coinmunoprecipitación (Co-IP) seguidos de LC-MSMS, lo que nos permite aislar e identificar complejos proteicos del hospedante que interaccionan con la proteína MP^{CPsV}. El espectrómetro de masas que utilizamos para la identificación de las proteínas coinmunopurificadas contiene un analizador Orbitrap de alta resolución y precisión de masa.

HIPÓTESIS

- Las proteínas de movimiento de los ophiovirus interaccionan específicamente con determinadas proteínas del hospedante.
- Tales interacciones son necesarias para garantizar el movimiento viral tanto célula a célula como a larga distancia.
- La MP de CPsV interacciona con proteínas celulares en su rol como supresora del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.
- La MP de CPsV interacciona con proteínas celulares para interferir con otros mecanismos de defensa antiviral de la planta.

OBJETIVOS

Caracterizar las interacciones ophiovirus-hospedante que tienen lugar durante la infección viral, y en particular, determinar los factores de la planta que interaccionan con la MP, aportando al descubrimiento de los mecanismos utilizados por los ophiovirus para cumplir su ciclo de vida en un hospedante determinado.

Ya que es altamente probable que la MP^{CPsV} forme complejos estables con proteínas celulares necesarias para la infección de CPsV, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Optimizar un protocolo de co-inmunoprecipitación para el aislamiento de proteínas de la planta que interaccionen con las MP^{Ophiovirus}
2. Aislar proteínas celulares que interaccionen con la MP^{CPsV} utilizando el protocolo previamente optimizado
3. Identificar mediante espectrometría de masas las proteínas celulares aisladas
4. Establecer relaciones funcionales entre las proteínas celulares identificadas y el mecanismo de acción de la MP de los ophiovirus en el ciclo infectivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento de proteínas de *N. benthamiana* que interaccionan con MP^{CPsV}

Para buscar las proteínas celulares que interaccionan con la MP^{CPsV}, esta proteína se expresó de manera transitoria fusionada a GFP (MP^{CPsV}:eGFP) en hojas de *N. benthamiana*, para luego realizar ensayos de coimmunoprecipitación (Co-IP) usando GFP-Trap_A (Chromotek), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Figura 66 se muestra un esquema del diseño experimental utilizado. Brevemente, se incubaron extractos de proteínas de las hojas agroinfiltradas con una suspensión de agarosa unida a anticuerpos anti-GFP de camélidos, que reconoce la porción de eGFP presente en la proteína de fusión MP^{CPsV}:eGFP. De esta manera, el cebo MP^{CPsV}:eGFP junto con las proteínas/complejos que se unen/interaccionan con él, sedimentan por centrifugación lenta. El extracto conteniendo las proteínas sedimentadas fue analizado por MS, Thermo Orbitrap Fusion; Thermo Scientific. Como control, se utilizó un extracto conteniendo las proteínas unidas al anticuerpo provenientes de hojas agroinfiltradas sólo con GFP con el fin de identificar las posibles interacciones inespecíficas.

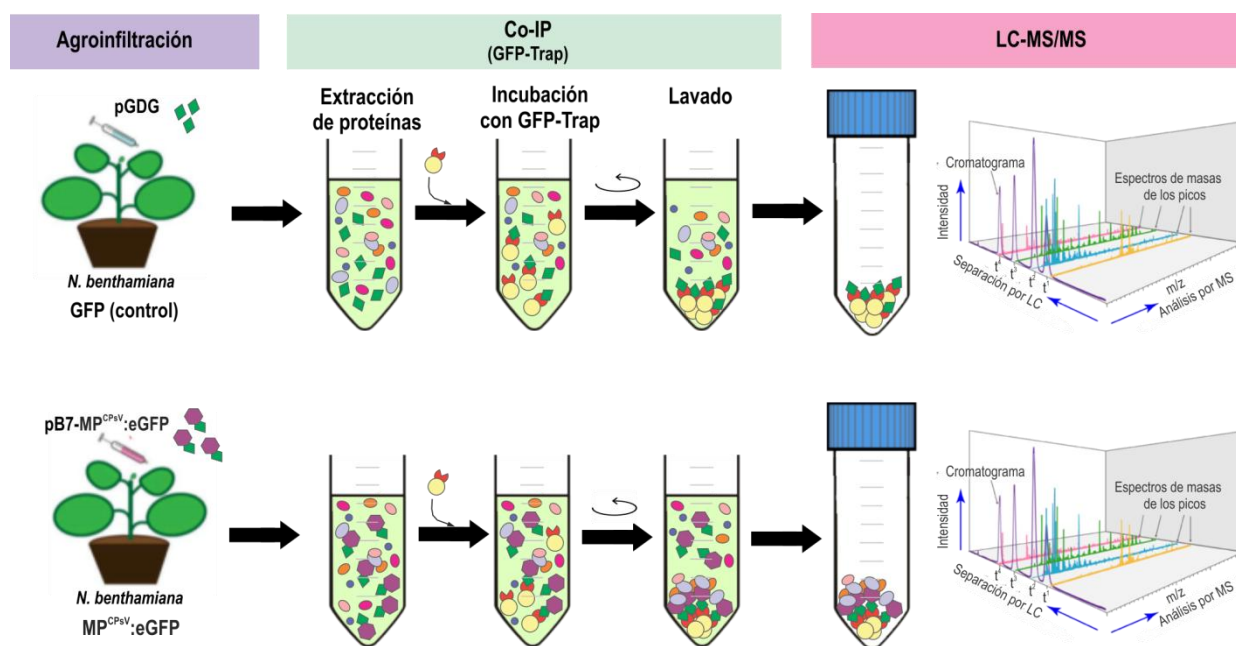


Figura 66. Esquema experimental para la búsqueda de proteínas celulares que interaccionen con la MP^{CPsV}. Los extractos proteicos obtenidos de plantas de *N. benthamiana* expresando de manera transitoria GFP o MP^{CPsV}:eGFP se incubaron con una suspensión de esferas de agarosa unidas a anticuerpo anti-GFP (GFP-Trap) y los complejos proteicos que se unieron a las mismas se sedimentaron por centrifugación lenta. El sedimento obtenido fue lavado varias veces y enviado para su análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

2. Análisis por SDS-PAGE de los sedimentos obtenidos en los ensayos de Co-IP

Con el objeto de analizar la calidad y cantidad de los extractos proteicos obtenidos, luego de realizar la Co-IP se tomó una muestra de los sedimentos y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 1D. Los mismos fueron teñidos con nitrato de plata y se analizó el patrón de bandas obtenido (Figura 67).

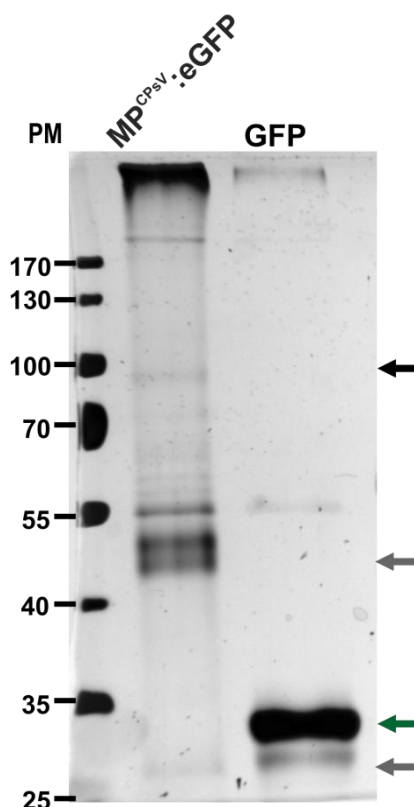


Figura 67. Análisis por SDS-PAGE 10% de los extractos co-inmunoprecipitados. Se realizó tinción con nitrato de plata (Blum et al., 1987). PM=marcador de peso molecular en kDa. La flecha negra señala la localización aproximada de la proteína MP^{CPsV}:eGFP, las flechas grises los péptidos originados por el autoclivaje de MP^{CPsV}:eGFP, y la flecha verde la posición de la proteína GFP libre.

Se realizaron tres ensayos independientes de Co-IP y se obtuvieron resultados semejantes al analizarse por SDS-PAGE-10%.

Comparando ambas calles del gel de la Figura 67, podemos observar que la calle correspondiente a la muestra MP^{CPsV}:eGFP presenta un número considerable de bandas diferenciales a las de la muestra GFP, las cuales se encuentran mayoritariamente entre 40 y 100 kDa. Estos resultados nos indican que el protocolo utilizado para realizar la Co-IP resultó efectivo en el aislamiento de proteínas o complejos proteicos que se encuentren interaccionando de manera específica, sea en forma directa o indirecta con la proteína MP^{CPsV}.

3. Análisis por espectrometría de masas (Orbitrap)

Los espectros obtenidos del análisis por MS se analizaron con el programa Proteome Discoverer, utilizando las bases de datos de *Nicotiana sp* y *Arabidopsis sp*. Los datos de MS mostraron un alto número de proteínas identificadas con la proteína MP^{CPsV}:eGFP como cebo, que no fueron encontradas en el control GFP. Se analizaron en conjunto los datos procedentes de los dos ensayos llevados a cabo.

De un total de 648 proteínas identificadas en la muestra MP^{CPsV}:eGFP, 414 (64%) proteínas fueron únicas para MP^{CPsV}:eGFP, mientras que las 234 proteínas restantes también fueron encontradas en la muestra control, por lo que no se tuvieron en cuenta en los análisis posteriores.

Los 414 candidatos de interacción resultantes se clasificaron de acuerdo a su localización subcelular (Figura 68). Se encontró un alto porcentaje de proteínas de cloroplastos (27%) y citoplasma (24%), seguidas por un porcentaje menor de proteínas nucleares (10%), mitocondriales (7%) y asociadas a membranas (8%). También se identificaron en baja proporción proteínas de Golgi, ER, PDs, apoplasto, proteasoma, peroxisomas, citoesqueleto y vacuola.

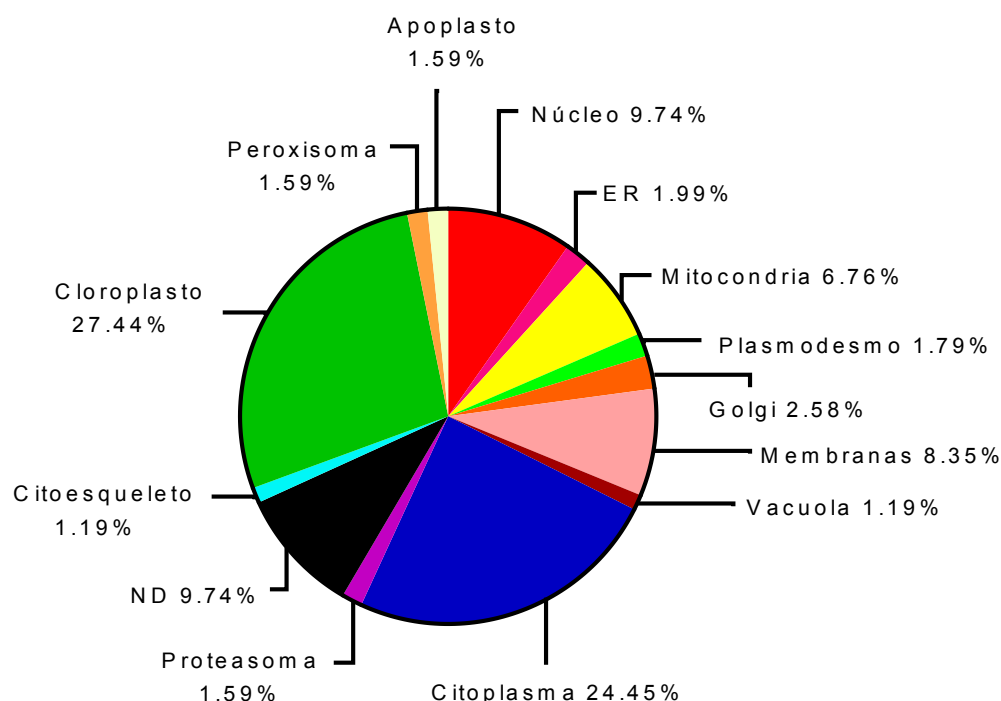


Figura 68. Distribución cuantitativa (%) de las localizaciones subcelulares conocidas o predichas para los 414 candidatos de interacción provenientes de dos ensayos independientes. ND, proteínas cuya localización no está determinada.

Estos candidatos de interacción fueron luego clasificados (*ranking*) de acuerdo con su PSM (*peptide-spectrum match*) medio. El valor de PSM de una proteína indica la sumatoria de los PSMs de cada péptido individual que pertenecen a ese hit. El PSM de cada péptido es el número de veces que se hizo espectro de MS/MS de ese péptido, valor que está directamente relacionado con la cantidad de ese péptido en la muestra. El valor medio del PSM de una proteína, es decir, su PSM total dividido el número de péptidos únicos identificados para ese hit, nos da una idea de la abundancia de esa proteína en la muestra, es decir, de la cantidad de proteína unida específicamente al cebo MP^{CPsv}:eGFP, y por lo tanto, puede ser utilizado como una medida de fiabilidad de cada interacción potencial. Teniendo en cuenta este *ranking* de interacción, el *score* y las funciones celulares de cada proteína, se eligieron los candidatos de interacción más interesantes, que se presentan en la tabla 3.

Proteína	Accession	PM (kDa)	IPSMI	LS	Proceso biológico
Atp-dependent zinc metalloprotease ftsh	A0A1J6HX57	76.6	1.1	Chl	Proteasa
Cysteine proteinase inhibitor	A0A059TCI1	10.8	1	-	Inhibidor de proteasa
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P12210	22.1	1	Chl	Proteasa serínica
Cysteine protease CP15	T2BQ67	51.7	1	-	Proteasa cisteínica
Aspartic proteinase a1	A0A1J6JU92	55.2	1	Vacuola	Aspartil proteasa. Metabolismo de lípidos
Aspartyl protease family protein	A0A1J6IJM6	56.5	1	M	Aspartil proteasa
26s protease regulatory subunit s10b	A0A1J6J9I2	44.6	1	Cit	Catabolismo de proteínas
26s proteasome non-atpase regulatory sub.11	A0A1J6J3V0	47.1	1	Proteasoma	
RPN9	Q076B1	41.1	1	Proteasoma	Regulación del proteasoma
F-box protein skip19	A0A1J6KD03	30.4	1	Nu	Ubiquitinación de proteínas
Polyubiquitin 8	Q39256	9.03	2	Nu, Cit, Ap	Procesos catabólicos dependientes de ubiquitina
2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase	A0A1J6KQ67	38.1	2	Chl	Síntesis de tocoferoles y plastoquinonas
Acetyl-coenzyme a carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	A0A1J6J3K9	81.1	2	Chl	Biosíntesis de ácidos grasos
Alpha-1,4-glucan-protein synthase	A0A1J6JE64	41.1	1.5	PD, G, Ap	Biosíntesis de celulosa
Caffeic acid 3-o-methyltransferase	A0A1J6IEI9	39.6	1	Ap	Síntesis de lignina
Hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase	A0A0H5AWB2	51.2	1	Cit, PD	Biosíntesis de isoprenoides y esteroides
4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (Ferredoxin)	A0A1J6HW98	82.1	1	Chl	Biosíntesis de terpenoides
Thioredoxin H-type 1	C9DFC1	13.3	1	Cit	Homeostasis redox, metabolismo de éteres de glicerol
Oxysterol-binding protein-related protein 3c	A0A1J6I066	52.1	1	Cit	Transporte de esteroides
Alpha-amylase 3	A0A1J6JLM8	110	3	Chl	Metabolismo de carbohidratos
Adenylylsulfatase hint1	A0A1J6J5A3	17.6	1	Peroxisoma	Metabolismo de purinas
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit	A0A1J6HWD1	40.2	2	Mit.	Ciclo TCA
Putative basal resistance related chitinase	Q4ZFU8	10.7	1	M	Catabolismo de quitinas
RCC1, Regulator of chromosome condensation	Q947D2	8.19	2	Nu	Regulador de la condensación de cromosomas
Origin of replication complex subunit 1B	Q9SU24	7.47	2	Nu	Replicación de DNA, transcripción
Nodulin homeobox	F4JI44	101.5	1	Nu, Nucléolo	Regulador negativo de la transcripción de RNA antisense
Pentatricopeptide repeat-containing protein	Q9MAT2	75.1	1	Organelas	Modificación de RNA
RNA polymerase alpha subunit	A0A1L2BNQ5	38.8	1	Chl	Transcripción
Calmodulin-binding transcription activator 6	Q9LSP8	95.3	1	Nu	Regulador de la transcripción
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Q38884	36.4	1	cit	Componente del complejo eIF-3 de inicio de la traducción
Nucleolar complex protein 2 homolog	Q9ZPV5	86.9	1	Nu,	Biogénesis de ribosomas

				Nucléolo	
Eukaryotic translation initiation factor3 subunitF	A0A1J6ILE4	31.4	1	Cit	Regulador del inicio de la traducción
Mediator of rna polymerase ii transcription subunit 36a	A0A1J6IVH2	32.6	1	Nu	Procesamiento de tRNA y rRNA
Elongation factor Tu	A0A1J6J5A5	48.9	1	Cit, Mit	Elongación de la traducción
Elongation factor 1-gamma 2	A0A1J6IA48	47.5	1	Cit	Factor de elongación de la traducción
Polyadenylate-binding protein 5	A0A1J6I4K2	52.2	1	Nu, Cit	Unión a la cola poly (A) de los mRNAs. Biogénesis, estabilidad y traducción de mRNAs
Protein modifier of snc1 1	A0A1J6IIE2	171.5	1	Nu	Regulación de la expresión del locus SNC1 a nivel de la cromatina
Leafy protein	D4I5W9	20.9	1	Nu	Regulador de la transcripción
29 kDa ribonucleoprotein b	A0A1J6I0M9	31.2	1	Chl, vRNP	Estabilización de RNA
Dead-box atp-dependent rna helicase 37	A0A1J6IJC4	66.2	1	Peroxisoma	Desplegado de estructuras secundarias de RNA
Gibberellin receptor gid1b	A0A1J6ITP3	38.9	1	Nu, Cit	Receptor soluble de giberelinas
Glutamate decarboxylase	A0A1J6IS54	55.8	1.5	Nu, Cit	Biosíntesis de GABA
ABA2	A8UDS7	47.3	1	Cit	Biosíntesis de ABA
Protein tss	A0A1J6JC11	208.9	1	-	Respuesta a ABA
Tripeptidyl-peptidase 2	F4JVN6	152.3	1	Chl, Cit, M, Vacuola	Respuesta a estrés
Kinase with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain-containing protein	F4IK85	78.1	1	MP	Respuesta a estrés
Cytochrome p450 94c1	A0A1J6JYX4	55.5	1	Chl	Vía de señalización del ácido jasmónico. Respuesta a heridas
Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein aim1	A0A1J6INQ7	78.1	1	Peroxisoma	β oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de ácido jasmónico
RHM1	A0A1J6K0S2	75.3	1	PD, Cit	Transporte de auxinas
B3 domain-containing protein REM16	Q8RYD1	38.7	1	Nu	Respuesta a Auxinas
Auxin response factor (ARF)	A0A1J6K8F5	76.9	1	Nu	Factor de respuesta a auxinas
Argonaute 4a	A0A0A1WCV4	101.9	1	Nu	Silenciamiento de RNA. Metilación de DNA
PDR-type ABC transporter 2	Q76CU1	122.2	1	M	Transporte de ABA. Interacción planta-patógeno
Harpin binding protein 1	E0X584	29.4	1	Chl, Nu, M	Defensa, organización de cloroplastos
Autophagy-like protein	Q4PL95	30	1	M	Autofagia
Hypersensitive-induced response protein 3	A0A1J6I4H6	45.9	1	M	Defensa. HR
TIR-NBS-LRR class disease resistance protein	B3H776	135.9	1	M	Defensa
RING-H2 finger protein ATL2	Q8L9T5	34	1	M	Defensa
Elicitor-responsive protein 3	A0A1J6L645	16	1	Cit, PM	Defensa, señalización
Cinnamoyl-coa reductase 2	A0A1J6J1Y9	35.6	1	Cit	Defensa. Síntesis de compuestos fenólicos asociados con la HR
Glycine-rich rna-binding protein	A0A1J6JV17	14.3	2	Nu, Cit	Unión a ácidos nucleicos. Defensa
Skp1-like protein	A0A1J6KBZ0	17.4	1	Nu, Cit	Interacción virus-hospedante, vía de señalización del etileno
Adenosine kinase 1 (ADK1)	Q9SF85	37.8	1	Celular	Interacción virus-hospedante. Defensa, silenciamiento de RNA
Cell division cycle protein 48-like protein (CDC48-like)	A0A1J6JM35	89.3	1.2	-	Chaperona
MIP1.2	U5PY93	46.8	1.4	-	Plegamiento de proteínas
MIP1.4a	U5PYM4	44.8	1	ND	Plegamiento de proteínas
Dnaj protein-like	A0A1J6KZT8	46.7	1.4	Cit	Plegamiento de proteínas
Calnexin-like protein (Fragment)	A0A1J6K8I8	78.4	1.3	ER	Plegamiento de proteínas, chaperona
Endoplasmic-like protein	A0A1J6JUR6	93	1	Cit	Chaperona
Heat shock protein 90-6	F4JFN3	90.5	1	Mit	Chaperona
Chaperone protein dnaj a6	A0A1J6IIV3	54.4	1	Chl	Chaperona
Dnaj protein erdj3b	A0A1J6IBW6	39.1	1	ER	Chaperona
Tetratricopeptide repeat domain-containing protein	F4JQB2	17.8	1	-	Unión a Hsp90
Hsp70-hsp90 organizing protein 2	A0A1J6J538	64.9	1	Cit, Nu	Media la asociación de las chaperonas HSP70 y HSP90

T-complex protein 1 subunit eta	A0A1J6IPU8	60.2	1	Cit	Chaperona
Protein tic110	A0A1J6IJT6	112.4	1	Chl	Importación de proteínas al cloroplasto. Responde a péptidos de tránsito a cloroplastos.
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	A0A1J6IFX5	54.6	1	Chl, Mit	Clivaje de péptidos de tránsito a mitocondria
Chaperonin cpn60-2	A0A1J6IMW5	61.3	1	Cit, Mit	Importación y ensamblado de proteínas mitocondriales.
Protein tic 100	A0A1J6K1L6	95.1	1	Chl	Importación de proteínas al cloroplasto
Protein TIC 214	Q33BW4	225.3	1	Chl	Importación de proteínas al cloroplasto
Protein translocase subunit SecA	A0A1J6JAB4	116.2	1	Chl	Importación de proteínas al cloroplasto
Inner membrane protein pf-1	A0A1J6K6W3	21	1	Chl	Inserción de proteínas en membrana
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein	A0A097BTX9	30.6	1	M	Transporte de proteínas de mitocondria
Protein transport protein sec13-like b	A0A1J6JDW3	25.1	1	Nu, G	Transporte de proteínas y mRNA. Movimiento viral
RabE1	I1Y996	23.7	1	PM, G	Tráfico de membranas desde Golgi a membrana plasmática
Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	F4JYE8	31.6	1	Cit	Transporte de complejos de ribonucleoproteínas
Protein suppressor of k(+) transport growth defect 1	A0A1J6KMH1	48.4	1	Cit, Nu, PD, endosomas	Transporte de proteínas
Coatomer subunit alpha	A0A1J6J297	137	1.1	Cit, G	Transporte intracelular de proteínas
Coatomer subunit beta	A0A1J6I8M1	105.8	1	Cit, G	Transporte intracelular de proteínas
Clathrin heavy chain	A0A1J6I4I0	192.9	1	Cit, M, Chl, PD, G	Transporte intercelular de proteínas
Ap-2 complex subunit mu	A0A1J6KE97	49.3	1	G, M	Transporte de proteínas
Patellin-3 (PATL-3)	A0A1J6IZV6	69.8	1	Cit, M	Transporte. Ciclo celular
Uncharacterized protein	A0A1J6JK25	50.6	1	-	Transporte
Myosin XI-K	B0CN61	172.5	1	Myosin complex	Transporte viral célula a célula. Unión a actina
Myosin XI-2	B0CN59	171.5	1	Myosin complex	Transporte viral célula a célula. Función motora
Myosin-6	A0A1J6L3G6	171.6	1	Citoesq.	Función motora
At3g53320	Q9LFI5	59.1	1	Cit	Complejo asociado a microtúbulos
Fibrillarin 2	B7VCB9	32.6	1	Nu	Procesamiento de tRNA, rRNA, movimiento de complejos de vRNP
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8	Q8RXK6	57.7	1	Cit, P-body, SG	Metabolismo de RNA, transporte de mRNA. Proceso viral. Respuesta a estrés. Interacción proteína-RNA
Actin	A0A1J6I0R8	41.7	1	Citoesq.	Transporte
Actin-depolymerizing factor 4	A0A1J6J1R8	16	1	Citoesq.	Despolimerización de filamentos de actina
Villin-3 (VLN3)	A0A1J6I449	104	1	Cit, Citoesq.	Ensamblado de haces de filamentos de actina
Ankyrin repeat domain containing protein 2 (ANK)	A0A0A7EAN9	37.1	1	Nu, Cit, Chl	Chaperona. Movimiento célula a célula de TMV
Calreticulin-3	A0A1J6IYI8	51.9	1	ER, PD	Chaperona. Movimiento viral célula a célula
Cytochrome f	A0A1L2BNM5	35.2	2	Chl	Fotosíntesis
Photosystem I reaction center subunit X	Q5EEQ1	13.4	2	Chl	Fotosíntesis
Magnesium protoporphyrin ix methyltransferase	A0A1J6IPF8	35.2	1.3	Chl	Biosíntesis de clorofila
Ultraviolet-b receptor uvb8	A0A1J6KGG0	122.3	2	Nu, Cit	UV-B fotoreceptor
Pentatricopeptide repeat-containing protein	Q66GP4	69.5	3	Chl	Modificación de RNA, organización de cloroplastos
Probable pectinesterase 30 (PME30)	Q3EAY9	55.4	1	CW	Modificación de las pectinas de la pared celular
Protein kinase pvpk-1	A0A1J6J952	72.5	2	Nu, Cit, PM	Serina/treonina kinasa

Putative lrr receptor-like serine/threonine-protein kinase irk	A0A1J6IFN1	104.9	1	M	Receptor de membrana con actividad kinasa
Heterotrimeric G protein beta 1 subunit	C5MTW1	35.8	1	Cit, G, M	-
ATP synthase delta chain	P32980	26.8	1.3	Chl	Síntesis de ATP
Developmentally-regulated g-protein	A0A1J6IUG0	44.6	1	Cit	-
Histone H2B	A2IBL2	15.8	1	Nu	Unión a DNA
Putative f-boxkelch-repeat protein	A0A1J6IHE4	41	2	-	-
14-3-3-like protein C	P93343	29.3	1	Nu	-
Stem-specific protein tsjt1	A0A1J6I1S9	27.3	2	PM	-
FtsH-like protein	C9DFA3	22	1.2	-	-

Tabla 3. Lista de proteínas celulares coinmunoprecipitadas con MP^{CPsV}:eGFP. Se indica el nombre de cada proteína, su número de acceso, su peso molecular (kDa), su valor de PSM medio (|PSM|), su localización subcelular (LS) y el proceso biológico en que está involucrada. M=membrana, PD=plasmodesmos, PM=membrana plasmática, G=Golgi, Nu=Núcleo, Cit=citoplasma, Citoesq=citoesqueleto, Chl=cloroplastos, SG=gránulos de estrés, Mit=mitocondrias, Ap=apoplasto, CW=pared celular, ER=retículo endoplasmático. Se destacan en **negrita** las proteínas con función conocida en el proceso de interacción planta-patógeno.

4. Análisis de las funciones de las proteínas celulares que coinmunoprecipitan con la MP^{CPsV}

Las 120 proteínas seleccionadas se clasificaron de acuerdo a su función celular y/o al proceso biológico al que están asociadas (Figura 69).

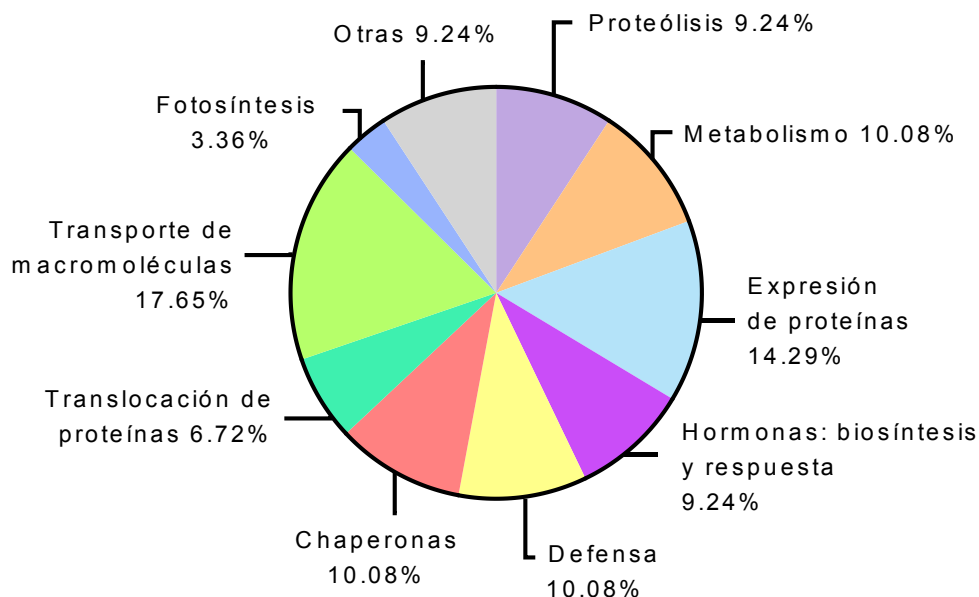


Figura 69. Distribución cuantitativa (%) de las 120 proteínas seleccionadas en base al proceso biológico al que están asociadas.

La gran cantidad de interacciones entre los virus de plantas y sus hospedantes, que tienen lugar durante la infección conducen a los trastornos fisiológicos responsables de las

enfermedades de las plantas, que en última instancia, representan las principales limitaciones a la productividad agrícola en todo el mundo. En general, en las interacciones planta-patógeno, las plantas activan una respuesta de defensa multicapa, incluyendo el silenciamiento de RNA, las vías de defensa mediadas por hormonas, la degradación de proteínas y la reprogramación transcripcional masiva, incluyendo la inducción de genes asociados con las respuestas de defensa. Sin embargo, los virus pueden hacer frente a estas señales de defensa de la planta suprimiendo el sistema inmune del huésped y/o manipulando la red de señalización de defensa del hospedante en su propio beneficio afectando la señalización hormonal o la ruta de degradación del proteasoma. Muchas proteínas supresoras virales pueden dirigirse a múltiples pasos de la vía de silenciamiento de RNA para vencer los mecanismos antivirales del hospedante.

En las siguientes secciones se describen algunas de las proteínas celulares seleccionadas que participan en los procesos de interacción con patógenos anteriormente mencionados.

4.1. Transporte de macromoléculas

La mayoría de las proteínas seleccionadas (18%) (Tabla 3, Figura 69) están vinculadas a los mecanismos de transporte intracelular de proteínas y ácidos nucleicos. En particular, dentro de este grupo se destacan la Miosina XI-2 y XI-K, Fibrilarina y PATL-3, las cuales se sabe por bibliografía que están involucradas en el transporte viral (Amari et al., 2014; Chang et al., 2016; Harries et al., 2009b; Kawakami et al., 2004; Kim et al., 2007a; Peiro et al., 2014). Para lograr el *gating* de los PDs, la MP^{TMV} interacciona con la proteína ANK (*ankyrin repeat-containing protein*) en el PD. La interacción entre MP^{TMV}-ANK conduce a una disminución de los niveles de calosa en los PDs y promueve el movimiento célula a célula de MP^{TMV} (Ueki et al., 2010), probablemente mediante el reclutamiento y/o la activación de β -1,3-glucanasas. Algo similar podría ocurrir entre la MP^{CPsV} y la ANK identificada. La ANK tiene múltiples actividades, incluyendo la unión y el transporte de cloroplastos a su destino, la resistencia a enfermedades causadas por bacterias y virus, y la participación en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno. Otra de las proteínas de las cuales se conoce su interacción con MPs, es la calreticulina. En este caso, la interacción inhabilita a la MP^{TMV} para llegar a los PDs, y por lo tanto tiene un papel negativo en el movimiento célula a célula de TMV (Chen et al., 2005). Otra proteína interesante es '*DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8*', ya que está reportado que las DEAD-box helicasas son cruciales para las vías de señalización que median las interacciones virus-hospedante en mamíferos (Andrejeva et al., 2004; Heung and Del Poeta, 2005). Se sabe que una proteína ADF (*actin-depolymerizing factor*) interacciona con la proteína P3 de Soybean mosaic virus (SMV), y que tal interacción sería necesaria para el movimiento de este virus (Lu et al., 2015). La proteína NTF2 (*Nuclear transport factor 2*) facilita el transporte de

proteínas al núcleo, y podría estar formando parte de un sistema multicomponente de factores citosólicos que se ensamblan en el complejo del poro nuclear durante la importación nuclear.

Las estrategias de movimiento célula a célula de los virus están necesariamente limitadas por el equipamiento celular disponible y por el hecho de que todos los virus estudiados hasta la fecha deben pasar a través de los PDs. La calreticulina, una proteína residente en ER que secuestra calcio, se une a MP^{TMV} *in vitro* e *in vivo* e interfiere con su localización en PDs (Chen et al., 2005). La calreticulina y la MP^{TMV} parecen compartir tanto los patrones de localización subcelular como las vías de transporte. Ambas se localizan en PDs (Baluska et al., 1999; Ding et al., 1992; Laporte et al., 2003; Tomenius et al., 1987), donde pueden ser transportadas por su asociación con el ER (Heinlein et al., 1998; Ostwald and MacLennan, 1974; Reichel and Beachy, 1998). Una posibilidad es que la calreticulina, que lleva un péptido señal, le suministre a la MP^{TMV}, que carece de tal secuencia señal (Atkins et al., 1991; Deom et al., 1991), la capacidad de entrar en la vía secretora, que finalmente entregará a ambas a los PDs. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que la calreticulina no es la única proteína asociada al ER que interacciona con la MP^{TMV}. De hecho, se ha demostrado que la llegada y el anclaje de la MP^{TMV} a los PDs requieren de la interacción con una pectin-metilesterasa (PME) asociada a la pared celular (Chen et al., 2000; Dorokhov et al., 1999; Lionetti et al., 2014). Esto sugiere que la unión a los factores del hospedante que contienen secuencias señal, puede representar una estrategia general empleada por MP^{TMV} para entrar en la vía secretoria. Sin embargo, la calreticulina podría tener un papel más activo en el movimiento viral. Por ejemplo, la interacción con MP^{TMV} podría alterar la actividad de la calreticulina dentro de los PDs, induciendo cambios en la permeabilidad de los mismos (Chen et al., 2005). Por último, tanto la actina como las miosinas son necesarias para la interacción entre la MP^{TMV} y los PDs (Amari et al., 2014; Hofmann et al., 2007).

4.2. Defensa frente a patógenos

Aproximadamente un 10% de proteínas que hemos encontrado están relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos. Dentro de éstas, se destaca la proteína AGO4, la cual se sabe que interacciona con las proteínas supresoras 16K de TRV, 2b de CMV y p37 de Pelargonium line pattern virus (PLPV) para inhibir la formación de complejos de silenciamiento de RNA (Fernandez-Calvino et al., 2016; Hamera et al., 2012; Perez-Canamas and Hernandez, 2015). Otra proteína interesante es '*PDR-type ABC transporter 2*', ya que se ha reportado que los transportadores ABC de tipo PDR están implicados en respuestas a patógenos (Stein et al., 2006). La proteína ADK1 también se destaca dentro de este grupo, como es el caso de las proteínas AL2 de TGMV y L2 de beet curly top virus (BCTV) que interaccionan e inactivan las adenosin quinasas (ADK) de la planta. Estas kinasas participan de

las vías de defensa mediadas por SNF1 y por el silenciamiento de RNA (Eckardt, 2003; Wang et al., 2005; Wang et al., 2003). Se ha descrito que la sobreexpresión de la proteína AtGRP7 (*glycine-rich RNA-binding protein 7*) confiere resistencia contra diferentes patógenos, entre los que se encuentra TMV (Huh and Paek, 2013; Lee et al., 2012).

4.3. Proteólisis

Del grupo de proteínas involucradas en el catabolismo de proteínas (9%), se destacan las relacionadas con el proteasoma 26S, como la proteína '*F-box protein skip19*'. La mayoría de las FBP (*F-box proteins*) caracterizadas son componentes del complejo SCF (SKp1, Cullin, F-box protein) E3 ubiquitina-ligasa. Este complejo participa en el reconocimiento y reclutamiento de proteínas diana para su ubiquitinación y degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma 26S (UPS, *ubiquitin 26S proteasome system*).

Las plantas emplean la vía del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) como una estrategia de defensa antiviral. Así mismo, se ha reportado que los virus explotan este sistema en su propio beneficio, induciendo, inhibiendo o modificando diferentes proteínas del hospedante relacionadas con la ubiquitina (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012; Correa et al., 2013; Verchot, 2016). El UPS desempeña un papel central en una amplia gama de procesos fundamentales de las plantas, incluyendo la degradación y la modificación funcional de las proteínas celulares y la señalización en respuesta a estímulos abióticos y bióticos (Luo, 2016; Sadanandom et al., 2012). En el contexto de las interacciones virus-planta, el UPS es utilizado por muchos virus para mantener niveles adecuados de proteínas virales y para lograr una infección exitosa. Los virus hacen uso del UPS para controlar la calidad de sus propias proteínas y para mejorar su efectividad. Concomitantemente, las plantas usan esta vía como otra capa de resistencia, dirigida principalmente a la degradación de las proteínas virales (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012). La participación del UPS en los mecanismos de defensa de las plantas ocurre a diferentes niveles, desde la ubiquitina hasta el proteasoma 26S (Dielen et al., 2011). Debido a la compleja red que involucra a diferentes componentes del UPS con proteínas virales de varios grupos de virus de plantas, se considera que la perturbación de la vía de ubiquitina podría ser un mecanismo conservado en las interacciones virus-hospedante.

En los últimos años, se ha encontrado que varias proteínas codificadas tanto por virus animales como por virus de plantas, redirigen los componentes de ubiquitinación del hospedante para sus propias necesidades. La mayoría de estas proteínas virales actúan sobre las vías celulares que dependen del sistema SCF para su regulación, como la inmunidad innata, la transducción de señales y las vías del ciclo celular (Chiu et al., 2010; Earley et al., 2010; Fusaro et al., 2012; Thiel et al., 2012; Thiel and Varrelmann, 2009; Ye et al., 2011). Además, se ha demostrado que

la subunidad RPN9 del proteasoma 26S contribuye a la diseminación sistémica de TMV y TuMV (Jin et al., 2006; Mekuria et al., 2008; Reichel and Beachy, 2000).

La proteína PME30 es otra de las proteínas que sobresalen en esta lista, ya que como se mencionó en la introducción de este capítulo, la MP de TMV y de otros virus interactúan con PME (*pectin methylesterase*) para facilitar el movimiento viral célula a célula (Chen et al., 2000; Harries and Ding, 2011).

4.4. Chaperonas

Un 10% de las proteínas identificadas resultaron tener función como chaperonas. Dentro de este grupo, se identificó la proteína CDC48 (*CELL-DIVISION-CYCLE protein48*), que como se mencionó anteriormente es inducida durante la infección por TMV, interactúa y promueve la degradación de su MP (Niehl et al., 2012). Se cree que CDC48 controla el movimiento de TMV mediante la separación de la MP de la vía de transporte por ER (Niehl et al., 2013).

4.5. Biosíntesis y respuesta a hormonas

Aproximadamente un 9% de las proteínas encontradas están involucradas en la biosíntesis, transporte y respuesta a hormonas. La alteración hormonal desencadenada por las infecciones virales se manifiesta como la inducción simultánea de muchas hormonas antagonistas y el concomitante desencadenamiento de las respuestas de defensa (Alazem and Lin, 2015). Las hormonas vegetales desempeñan un papel importante en los sistemas de señalización intercelular y sistémica, regulando los procesos de desarrollo y las respuestas de las plantas frente al estrés biótico y abiótico (Bari and Jones, 2009). El papel del ácido jasmónico (JA) en la defensa antiviral es controversial. Se ha reportado durante la infección por geminivirus que los genes implicados en la vía del JA son generalmente suprimidos (Ascencio-Ibanez et al., 2008). En contraste, múltiples genes relacionados con esta vía de señalización resultaron regularse de manera positiva en plantas de tabaco transgénicas que expresan la proteína supresora AC2 de African cassava mosaic virus (Soitamo et al., 2012). También se ha demostrado que la vía del etileno podría desempeñar un papel importante durante la defensa antiviral (Fischer and Droge-Laser, 2004; Love et al., 2007; Love et al., 2005). El ácido abscísico (ABA) desempeña un papel clave en la modulación de las respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico. Aunque la participación de ABA en el estrés biótico se ha estudiado ampliamente, el rol del ABA en la replicación y movimiento viral no están aún bien caracterizados (Alazem et al., 2014; Alazem and Lin, 2015). Las infecciones virales también pueden perturbar las rutas de señalización de auxinas, citoquininas y giberelinas. La replicasa de TMV interactúa con proteínas relacionadas con la auxina IAA, dando lugar a modificaciones en la regulación génica mediada por auxina (Padmanabhan et al., 2005; Padmanabhan et al., 2008). La proteína

AC2/AL2 de geminivirus interacciona con una ADK de arabidopsis, lo que conduce a un incremento en la expresión de genes de respuesta a citoquininas (Baliji et al., 2010).

4.6. Kinasas

La proteína PVPK1 y el receptor de membrana IRK que hemos identificados pertenecen a la familia de las Ser/Thr protein kinasas. Se ha reportado que una proteína de membrana con dominio Ser/Thr kinasa de *N. benthamiana* estaría involucrada en la regulación del movimiento célula a célula de BaMV (Cheng et al., 2013). Además de ésta, muchas otras kinasas están involucradas en el ciclo viral, principalmente regulando la actividad de las MPs (Lee et al., 2005; Matsushita et al., 2003; Modena et al., 2008).

En resumen, los resultados presentados en este capítulo nos abren un nuevo panorama en cuanto a la biología de la infección de CPsV, y muy probablemente a la de otros ophiovirus, permitiéndonos plantear diferentes hipótesis sobre los mecanismos celulares que tienen lugar durante su ciclo infectivo.

Como se ha mencionado, algunas de las interacciones entre proteínas virales y celulares pueden explicarse de varias maneras, lo que sugiere que estas interacciones pueden ser multifuncionales.

Debido a la diversidad de proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa que posiblemente interaccionen con la MP^{CPsV}, podemos hipotetizar que la MP de los ophiovirus podría ser considerada como un inductor de la defensa del hospedante *N. benthamiana*.

CONCLUSIONES

- Se optimizó un protocolo para el aislamiento de complejos proteicos que se encuentran en asociación con la proteína MP^{CPsV} que permitió la identificación de las proteínas presentes.
- Se identificaron por espectrometría de masas 414 proteínas co-inmunoprecipitadas de manera específica con MP^{CPsV}, utilizando las bases de datos de *Nicotiana sp* y *Arabidopsis sp*.
- Se realizó una búsqueda bibliográfica correspondiente a la información accesible de las proteínas más interesantes o atractivas desde el punto de vista de su función, sea celular o en el ciclo viral.

PERSPECTIVAS

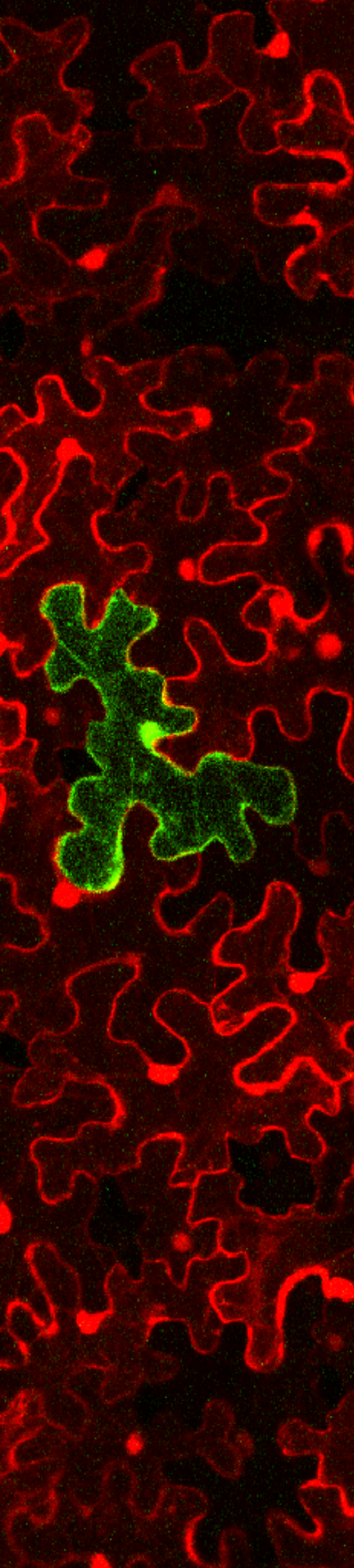
Se validarán los datos de proteómica obtenidos mediante ensayos que nos permitan comprobar tales interacciones *in vivo*. Para esto, se realizarán ensayos de FRET-FLIM entre la MP^{CPsV} y algunas de las proteínas que coimmunoprecipitan con ella, que serán seleccionadas en base a su posible rol en el ciclo viral. Se clonarán los genes codificantes de estas proteínas en plásmidos binarios que permitan su fusión traduccional a proteínas reporteras fluorescentes. Una vez comprobadas tales interacciones, se analizará la funcionalidad de las mismas mediante la generación de plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* silenciadas, que serán desafiadas con CPsV. Se evaluará el curso de la infección, esperando observar cambios en el fitness viral, ya sean positivos o negativos. Debido a que *N. benthamiana* es hospedante local y asintomático de CPsV, esperamos encontrar alguna proteína celular involucrada ya sea en la defensa como en el movimiento viral, cuyo silenciamiento de como resultado un cambio drástico en favor de la infección. Por el contrario, debido a que en *N. occidentalis* el virus puede moverse e infectarla sistémicamente, buscaremos silenciar aquellas proteínas celulares que estén interaccionando con la MP para favorecer el proceso infectivo.

Como se mencionó en el capítulo 2, la proteína MP^{CPsV} tiene la capacidad de autoclivarse, originando dos péptidos de menor tamaño, cada uno con propiedades específicas (Robles Luna et al., 2017a). Teniendo en cuenta este procesamiento, en los ensayos de coimmunoprecipitación realizados con la proteína MP^{CPsV}:eGFP, aquellas proteínas celulares que interaccionan de manera específica con el péptido N-terminal originado luego del autoclivaje no fueron identificadas. El péptido N-terminal es el que contiene el dominio 30K (mencionado en el capítulo 1), por lo que es de particular interés repetir los ensayos de coimmunoprecipitación con este péptido fusionado a eGFP, construcción que ha sido obtenida por Gabriel Robles Luna en nuestro laboratorio. En este ensayo, esperamos aislar proteínas que estén en su mayoría relacionadas con el transporte celular y los PDs.

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que la MP de CPsV sería capaz de interaccionar con numerosos componentes del hospedante, posiblemente produciendo una amplia gama de efectos fisiológicos en éste, incluyendo la modificación del SEL de los PDs, la inducción de diferentes hormonas y la alteración de los mecanismos de defensa.

Debido al gran número de efectos fisiológicos que posiblemente esté causando la expresión de MP^{CPsV} dentro de la célula, y ya que contamos con líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan de manera constitutiva esta proteína viral, sería muy interesante poder medir diferentes parámetros metabólicos y fisiológicos en estas líneas, como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, el grado de acumulación de calosa en los PDs, los niveles de ácido salicílico y hormonas, el nivel de expresión de determinados genes, en particular aquellos

asociados a los mecanismos de defensa antiviral, entre otros. Estos datos nos brindarán una idea de los procesos metabólicos que están siendo afectados por la expresión de MP^{CPsV}, posiblemente relacionados con algunas de las proteínas celulares identificadas en los ensayos mostrados en este capítulo.

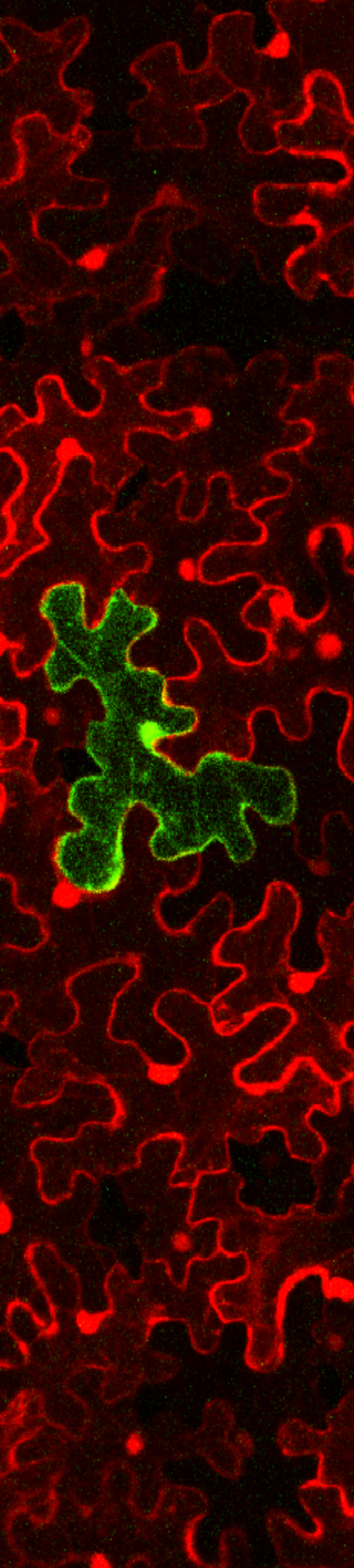


CONCLUSIONES GENERALES

The simplicity of the genome structure of plant viruses belies the true impact that plant virus proteins have on the physiology of the plant.
(Schoelz *et al*, 2015)

CONCLUSIONES GENERALES

- Se determinó la pertenencia de la MP^{ophiovirus} a la superfamilia 30K de proteínas de movimiento viral, encontrándose un residuo de ácido aspártico altamente conservado que es fundamental para las funciones de movimiento viral célula a célula de la MP
- Se identificaron posibles dominios y motivos funcionales presentes en la MP^{CPsV}: 1) una NLS_BP funcional entre los aminoácidos 255 y 271, 2) una posible PLS presente en el extremo N-terminal, 3) un péptido de tránsito a cloroplastos de 21 residuos aminoterminales, y 4) un dominio C-terminal necesario para el auto-clivaje de la MP.
- Se identificaron posibles dominios y motivos responsables de la localización subcelular de la proteína 24K de CPsV: 1) una NES entre los aminoácidos 156 y 170 involucrada en la fusión de los agregados nucleolares, 2) un motivo WG entre los aminoácidos 11 y 18 que sería responsable de la localización de 24K en *D-bodies*, 3) un dominio C-terminal necesario para la acumulación nucleolar de 24K, y 4) un dominio N-terminal requerido para la acumulación de 24K en *Cajal bodies* y otros agregados nucleolares.
- Se encontró que el transporte sistémico de CPsV estaría regulado por la actividad de su MP.
- Se identificaron 414 proteínas de la planta que posiblemente interaccionen con MP^{CPsV}. Encontrándose que un alto porcentaje de las mismas participan en el transporte celular de macromoléculas y en las distintas etapas de expresión génica. También se identificaron proteínas asociadas con la respuesta frente a patógenos y hormonas, y proteínas del sistema ubiquitina-proteasoma



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.) o Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU.), PIERCE (Pierce iotechnology, Rockford, Illinois EEUU). Kits de clonado de Thermo Fisher Scientific (USA), y de co-inmunoprecipitación (Chromo Tek, Alemania).

1.2. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* detalladas a continuación.

Escherichia coli

- **DH5 α F'**: *E. coli* supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.
- **TOP10**: *E. coli* F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ -.

Agrobacterium tumefaciens

- **GV3101**::pMP90: con resistencia a Rifampicina en el genoma y Gentamicina en el plásmido Ti, pTiC58 Δ T-DNA.

1.3. Vectores de clonado

- pCR8GW/TOPO, Thermo Fisher Scientific (USA).
- pGEM-T, Promega (Madison, EEUU)

1.4. Plásmidos binarios

- Plásmidos pB7FWG2.0, pB7RWG2.0 y pB7WGF2.0 para el desarrollo de fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes (Karimi et al., 2002). Cedidos gentilmente por División de Genómica funcional del Departamento de Biología de sistemas de plantas (VIB-Ghent University).

- pBin61-P19: para expresión *in planta* de la proteína supresora del silenciamiento génico P19 (Voinnet et al., 2003).
- pGDG: para la expresión de GFP citosólica (Goodin et al., 2002).
- pPDCB1:mCherry: para la expresión de la fusión C-terminal a mCherry de *Plasmodesmata callose binding protein 1* (Simpson et al., 2009).
- pRFP: para la expresión de la proteína mRFP libre (Robles Luna et al., 2013).
- pROK.2.Fibrillarin-mRFP: para la expresión *in planta* de la proteína fibrilarina fusionada en su extremo C-terminal a mRFP (Kim et al., 2007b).
- pROK.2.U2B"-mRFP: para la expresión *in planta* de la proteína U2B" fusionada en su extremo C-terminal a mRFP (Kim et al., 2007b).
- pK7RWG2.0-TUA2:mRFP: para la expresión de α -tubulina fusionada en su extremo C-terminal a mRFP (Van Damme et al., 2004).

1.5. Vectores virales

- pJL24: para la expresión del virus TMV:GFP (Lindbo et al., 2007).
- pJLTRBO-GFP: para la expresión del virus TMV Δ CP:GFP (Lindbo et al., 2007).
- pCB301-CMV RNA 1: para la expresión del RNA1 de CMV (Shen et al., 2014).
- pCB301-CMV RNA 2: para la expresión del RNA2 de CMV (Shen et al., 2014).
- pCB301-CMV RNA 3: para la expresión del RNA3 de CMV (Shen et al., 2014).
- pCB301-CMV RNA3-MP::erGFP: para la expresión del RNA3 Δ MP::erGFP de CMV (Shen et al., 2014).
- pCXSN-CMV MP: para la expresión de la MP de CMV (Shen et al., 2014).

1.6. Cebadores

En la siguiente tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante el trabajo de tesis.

Nombre	Secuencia 5'-3'
24Ks	ATGGCTGAATATATAGAAG
24Kas	CTCGCGGAAAGAATTGTCTG
24Kf	ATATATAGAAGTAAGAGTTGAAAATTTACA
24KW15As	GAAAATTTACACAAAGCTGGGTTGGAATTG
24Kmut1s	ATGATAGTCAATGAGGATTGCATC
24Kmut2as	TATCCAATTTAGTATTCTTG
24Kmut3s	AGAAGAGCTGCTAGAAAACAAAATAGATG
24Kmut3as	TGTTTTCTAGCAGCTCTTCTGTTATTTC

A	TAGATCCATGCTCAGTCACC
B	GGTCACAGGTAGTAACAGTT
M13 Forward (-20)	GTAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
54KD141A_s	GTAAGCTTGGTTGCTGATGGAAAAG
54KD141A_as	AGCTTCTTTTCCATCAGCAACCAAG
54Kmut1s	TGAGCACAAACTTGGAGGTGAAAGTAGTC
54Kmut1as	TCACCTCCAAGTTTGTGCTCATCCTTTTGT
54Kmut2s	AGATAAACCAAAGGGAAGGGAAGGGTGTG
54Kmut2as	TCCCTTCCCTTTGGTTTATCTCATCAGACAC
54Kmut3s	AGGAGTTGCTTACACACTGTTGAAGGAGG
54Kmut3as	ACAGTGTGTAAGCAACTCCTCCAAAATTTC
54Kmut4s	ATGGAAGGCATTAATGATGCC
54Kmut5as	AGACAAAATATTGTCCCCAAGG
55Ks	CATATGCAAAACAGTTTTTCATCC
RNA2as2	GCATATAGATCTTCAATCTATC
55D174As	TTCGATTAATGCTAGTTCTGTAAGG
55D174Aas	ACCCTTACAGAACTAGCATTAAATCG
CMVRNA3ΔMP_R	GCCTCGGGAAATCTAACAC
CMVRNA3ΔMP_F	CACTTTGGTGCGTATTAGT
CMVRNA3:54k_F	GTGTTAGATTTCCCGAGGCATGTCAATGGCAAGCTTT
CMVRNA3:54k_R	ACTAATACGCACCAAAGTGTCACTCAATTTTGATCTCA
MP-CMV_r	GAAACGCATTGCCCATCT
MP-CPsV_r	CCATTGTCACCGTCTACC
CMV-RNA3_f	ATTTGAGTCGTGCTGTCC
GFP-ER_r	GGGTGTCTCCCTCAAAC
pTRBOGΔMcfw	GGTTACCTAAATAATAGACGGAGGGCCCATGGAAC
pTRBOGΔMcrev	TCTATTATTTAGGTAACCTTTGTCAGGTCGATAAACTC

1.7. Sueros

- Suero anti ratón IgG-HRP: goat anti-Mouse-IgG (H+L) – HRP conjugate (Bio-Rad)
- Suero anti rata IgG-HRP: goat anti-Rat IgG (H+L) – HRP conjugate
- Anticuerpo monoclonal anti GFP JL-8 (Living colours, Clontech, USA)
- Anticuerpo monoclonal anti GFP 3H9 (Chromotek, Alemania)
- Anticuerpo monoclonal anti mRFP 3F5 (Chromotek, Alemania)
- Anticuerpo monoclonal anti FLAG (Sigma Aldrich,)

1.8. Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento

En los ensayos biológicos se utilizaron las especies: *Nicotiana benthamiana* wt, *Nicotiana occidentalis* wt, y líneas transgénicas de *N. benthamiana* Tg 54:06 y 48:02 que expresan las proteínas de CPsV MP y CP, respectivamente, bajo el promotor constitutivo 35S.

Todas las especies vegetales se mantuvieron en cámaras de cultivo a 22-25 °C, con un fotoperíodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, desde su germinación hasta su utilización, 4-5 semanas. En el caso de los ensayos de larga distancia, las plantas inoculadas fueron trasladadas a invernáculo, mantenidas bajo condiciones de temperatura entre 18 a 29°C.

1.9 Secuencias aminoacídicas de las proteínas virales de ophiovirus que se utilizaron en los análisis bioinformáticos

>gi|50355590|ref|YP_053237.1| 22 kDa protein [Lettuce ring necrosis virus]

MDLLENATQGTESNCEQGVNLLKASGHILTEYTLHEKKVVERNSHEYQKLMKYKTSYTEEGRFLFGSW
LLTSDKVPRIFDKKAVII IKTLSNFVDVFLYDDIFISLTQKICDI FTSLFFQLYKVDAMISFGDKKIYRL
ENGYTIPHYSMILSKEEERSKRNLLENALRTLSNDNEKKCDSTCSLSVSTMKHF

>gi|663441663|gb|AIF28242.1| 23 kDa protein [Blueberry mosaic associated virus]

MQVCDRNNRKDRSFKRYKLSSKELINIKINDKLFETEEKFMKYNHGI EGETKRCLFGLWMFESSNCNSYI
FRKKGVI FL SKEHDVHMTSYFDDIEICICNEKFELLS EDSYNNLTGDMIFKVPNHNLYELYAHDDKKKEN
TLFSMLEESEKTKYTELKR SIRKLVIHDEKRKFSSAQSSFKDAETSSGIRDPVE

>gi|30059153|gb|AAO34633.1| 24 kDa protein [Citrus psorosis virus]

MAEYIEVRVENLHKWGLELNT EQIETLSKKLKNIVNEDC IMKTSRIIGMWIFMPDIVQESLKDSPLVTKK
AWIIPHERTYKTIYKGDGIQMAVTQNEEDLFKDPEFFMISRCDSVMLTKNNKTI IINKELMNCDISQDML
FNMLSCQE QEITEELLKKLKII ISSNPKERLENKIDEVFWNSTRI LNWIQHNDNSGSNSSDNSFRE

>25kDa protein [Mirafiori lettuce big-vein virus-isolate LP2]

MSQFKDKSILKSNEVPEEMFTCISGSTDTNGEMKTVISKGNEEKSLMKTKNKVNRI RLFLNYHVKELPI
MDHSIAERNSEMMKTMRYKTSYREVTRFLIGSWLLFAEKLIPPFNMKAI I I IETDQKLVDVADFE GIEI
LLGNNIQSCLDSFYMRFYKEDLILYNTANELLLLIDNFKIPKYFAKLDMNQVRLKKIIEKKYISLIKAGK
L

>gi|50355591|ref|YP_053238.1| 50 kDa protein [Lettuce ring necrosis virus]

MSGINVFSNNSVQLARMKGKAIDNGSSLPVVSFRKASEHMIN EGIGTLVSLKGGNNFSEEIECMASEFKE
VIKGEIKSIVSPITIKLKDSESTTKVKIT TMDKVTSLIKFEKFPFYRVDRLKILYIPLFSGENSEGKNIT
FSIQDRSMVVAGPKPKKISSATAPINKMSMIELSATYFVQSKDLSKIEFGYKAKGIPVSGRSFAAVYLAFY
IHGDHFPATMRPKDPIVLLIDDVDAPTDINKTSSVKDLCDKVHKRIESKSKQMNDRSRFEILEERRKSD
MLLIKENIEESNTSNPTFSVKENNSELFHGITKANIAEYLPRLPISQWENAILDTGAPDHWCYHPNIVD
LKVMGSEDALEEGVNFHRVRDVEVKLG VHWIRLREVLFGRKDDRPLISYNKLMKSGIIDS LNKVTKSKSI
LCCEGKVMFDLDTSGGYQVFIPSESTSR TIIIE

>gi|21321329|gb|AAM47152.1| 54 kDa [Citrus psorosis virus]

MSMASFKSASKRITGNENVTRISANSAIN SIVKKGELNVISLKDGN TADLEGINDALLDYRRILKNEIKT
AVSPITMKLKKDEHKKKLKLGTLKSITDKLRKLGGESSHPFIQFYKVQCMYIPLFSRVGDNGEITVSLV
DDGKEAAGQDPVIQSITFDASQMAMVELSMNFFVEKRDMDFIGIHISAGNVPVQDRAYGSINLAFFTNEQ
SVPMMQEEKKSSYLMIDAVNRPKDVT KSSVFKSIGDRVSDEINQKRDEYKKKMIENERIRREGKGVKIE
TETNGSSSSDAETLLEEARKSVSINLSNFLADQRRAPPPQLEKRTFQWPCGVKMLTMMDTGSSSHYFFS
RSINPTSIERNFGGVAQLEVERAKLTFETFGNKFLKDVFMFSDQTLGDNILSYTLLKEEGHIDGMRTAG
DDVLLKDG EVVMILDSRDEGRMWIKDDVWAEVTEHGSKSAREYCMKIERSEIKIE

>gi|24417723|gb|AAN60448.1|AF525936_3 55K protein [Mirafiori lettuce big-vein virus]

MQNSFHFNFTIKEINLVKVN TKIVNKKMASQSNLVS RGTSGVIKGKNEQKSNFKHLSSVSFSKASDDMM
QEGITILASMRSEGPLSPEIECMASEFKDAIQGDINSVSPMKLRLHKSEDT SKVKIGTMASLVAALPGQ

SYPFYRIDRLKIIYMPLFSSDLAEGKKITFSINDSSVRIGHGSKTISKTDAPLNRMISMIELHSPFFVPKD
NIKMIEFGYKTTGVPVSGRAFAFVCLAFYIQRDFIPVSIKKKDPIILLIDIDRPSDINTTSSMKKLVGE
VKNKRIEKKKGKFNESMIKYEKDLEERNRMAFVDNDQDSGFHVSEKAEP SKMKDTLEGVHLMEENIPDYL
PRRLPVYNWEGAILDTGAPDHWFYNP NLIGLQEDIDSVGLIEGRTFYRVRGVEVKLG AHWIRMKEILYAR
KRDMPLISYMRLCRAKIVDTLKTLEDGSAVLCNGKVI FELTCTGSYMVFKKSGDTSREMMTE

>gi|663441665|gb|AIF28243.1| 58 kDa Movement Protein [Blueberry mosaic associated virus]

MSIRSGRSGIGKGKEIQVSKRLDAMSLGND SKRIGTISAKNVLNDLVKNGDLNVISLGGDGSALPDGIED
IAAEFADVQKGIITS AISPLTMTLKR DQERKKVPIATMGRVVNLFKKATGNEMP FVKFEKVQVMYIPLFQ
KTNEEDDPDKKIPSMTVALVDKGQEEAGGDGI IQSITFRADEMALMELSMNFFVTRKDIEKIVVDACVDE
IPVEGRAYGAMTIAFFVHEDYVPLRTELKPSTLMYITAMKNPKDMNTKTI FRGMGEKVIKELNSEKEKYK
AKSLQRKKELRQRGKKVIEKEEDEQKSTSSES RADLESVIEAGRKSVMVNEWLKMNKEKGKEDFETSS
VAIGPSVRVNKIRHRNSDHPGLVTMLDTGSDKHFFFARRINPNN SVKNFGGIPFLPVETAEMDFNVNGVN
FHLDEVYMF TGRGLGSNLSFSKLKEQGLVDDMVTAGNNLYLQKGEEI IMTFDATESGRMWLKD DAWRNA
RERFGNNPGTSAEEEEVRTGKV DLMN

2. Métodos

2.1. Minipreparación de DNA plasmídico

2.1.1. Método de lisis alcalina

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano saturado en medio LB (*Luria Bertoni*) con el antibiótico adecuado se centrifuga a 14000 xg durante 1 minuto. Este procedimiento se repite tres veces. El *pellet* obtenido se resuspende en 200 µl de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA) con el agregado de RNasa A a una concentración final de 20 µg/ml, se agregan 300 µl de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % v/v SDS) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se agregan 300 µl de Solución III (3M acetato de potasio pH 4,8) permitiendo la neutralización de la solución. Se incuba en agua-hielo durante 5 minutos y se realiza una centrifugación a 14000 xg por 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le realizan dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol frío. Se centrifuga por 20 minutos a 14000 xg, el *pellet* se lava con etanol 70 %, se deja secar y se resuspende en agua bidestilada estéril.

Cuando la preparación de DNA plasmídico es utilizada para secuenciación automática, luego de las extracciones con cloroformo, se agrega 20 µl de una suspensión de sílica, se incuba 5 minutos en agitación suave, luego se sedimenta la sílica por centrifugación 10 segundos a 14000 xg, se descarta el sobrenadante y se realizan tres lavados con solución de lavado (50mM NaCl, 10mM Tris pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 50% etanol). Luego de los lavados, se deja secar la sílica al aire para eliminar el etanol residual y se eluye el DNA en el volumen necesario de H₂O bidestilada. Para favorecer la elución del DNA, se incuba 10 minutos a 60 °C.

2.2. Extracción de RNA de tejido vegetal

La extracción de RNA total de material foliar para su análisis por RT-PCR se realizó utilizando el reactivo Tri-Reagent (Molecular Research Center, MRC, EEUU) según especificaciones del fabricante. Partiendo de 50 a 200 mg de tejido, previamente molido en N₂ líquido. El RNA total obtenido se resuspendió en 10 a 50 µl de agua bidestilada estéril libre de RNAsas.

2.3. Reacción de transcripción reversa (RT)

Las reacciones de RT se realizaron en 10 µl finales. Partiendo de 1 a 2 µl de RNA total de tejido foliar, se agregan los cebador directo y reverso a una concentración final de 10 µM cada uno y 1 µl de agua bidestilada libre de RNAsas. Se incuba a 85°C durante 10 minutos y se enfría rápidamente en agua-hielo por 5 minutos. Se agregan 100U de transcriptasa reversa M-MLV

(Promega, Madison, EE.UU), 20 U de RNAsin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega, Madison, EE.UU), 1 µl de dNTPs (10 mM de cada uno) y 2 µl del *buffer* 5X de la enzima. Se incubó a 42°C por 90 minutos y luego a 70°C durante 15 minutos. El producto generado en la reacción de RT se utiliza posteriormente como molde en reacciones de PCR.

2.4. Reacción de PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER). Los protocolos de reacción se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones de cada fabricante, según la enzima utilizada (*Taq* DNA polimerasa, INBIO Highway; *Pfu* DNA polimerasa, INBIO Highway; *Pfx* DNA polimerasa, Thermo Fisher Scientific; o Platinum Super Fi DNA polimerasa, Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de ciclado generalmente fueron de 3 minutos a 94°C como etapa inicial de desnaturalización, 35 ciclos de 20'' a 94°C, 20'' a la T_m del par de cebadores usado en cada caso, una etapa de extensión a 72°C (o 68°C para la *Pfu* DNA polimerasa) durante el tiempo requerido por la polimerasa para amplificar cada fragmento (por cada 1Kpb a amplificar se utilizó 1' de extensión con la *Taq* y *Pfx*, 2' para la *Pfu* y 30'' para la Platinum Super Fi) y una etapa de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1-2% en *buffer* TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

2.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer). El fragmento de gel que contiene el DNA a recuperar se disolvió con 3 volúmenes de NaI 6M, calentando a 60 °C por 15 minutos o hasta que el fragmento se disuelve por completo. Esta solución se deja enfriar por unos minutos, se mezcla y se hace pasar por una columna de sílica. La columna se lava tres veces con solución de lavado (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol) y se deja secar al aire para eliminar los restos de alcohol. Finalmente se agrega agua bidestilada estéril sobre la matriz de sílica de la columna, se incubó por unos minutos a 50 °C, y se centrifuga durante 1 minuto a 14000 xg. El eluido contiene el DNA de interés.

2.6. Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes

2.6.1. Bacterias competentes para electrotransformación

El protocolo para la obtención de bacterias de *E. coli* competentes para electrotransformación se basó en el reportado por Dower et al. (1988). Las bacterias se lavaron con glicerol 10% v/v para eliminar todas las sales que pudieran interferir en la conducción del pulso eléctrico. A partir de un cultivo saturado se realizó una dilución 1:100 en 1 litro de medio LB sin NaCl y se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO600 de 0,5. Las bacterias se centrifugaron a

4°C durante 10 minutos y a 5000 xg. El sedimento bacteriano se resuspendió en glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repitió tres veces disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% v/v, se fraccionaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de bacterias competentes de *A. tumefaciens* para electrotransformación, se partió de 1L de cultivo inoculado inicialmente a partir de una única colonia de bacterias, crecido a 28°C durante el tiempo necesario para alcanzar una $DO_{600nm}=0,5-0,6$ (aproximadamente 16 a 18 horas). Las bacterias se incuban durante 15 minutos en hielo y se centrifugan a 6000xg durante 15 minutos a 4°C. El *pellet* se resuspende en 500 ml de H₂O bidestilada estéril a 4°C y se centrifuga nuevamente a 6000xg durante 15 minutos a 4 °C. El *pellet* obtenido se resuspende en 5 ml de H₂O bidestilada estéril a 4°C y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente las células se resuspenden en 2 ml de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -80°C hasta su uso.

2.6.2. Transformación mediante electroporación

Para realizar las electroporaciones se utilizó un electroporador *Bio-Rad Gene Pulser™*. Se mezclaron las bacterias electrocompetentes con el plásmido o producto de ligación deseado, se incubó en hielo durante 5 minutos y se colocó la mezcla en una cubeta de electroporación. Una vez ajustadas las condiciones de electroporación (2,2kV/0,2cm; 25µF y 200Ω para *E. coli*, 2,2kV/0,2cm; 25µF y 400Ω para *A. tumefaciens*) se sometió a las bacterias al pulso eléctrico. Inmediatamente se las diluyó con medio SOC sin antibiótico, se las incubó durante 1 hora a 37°C para *E. coli* o 3 horas a 28°C para *A. tumefaciens* y se las sembró en placas de LB conteniendo los antibióticos correspondientes.

2.7. Colony-PCR

La presencia y tamaño de los insertos se verificó por PCR, con los cebadores correspondientes en cada caso. Para ello, se utilizó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en medio sólido que se resuspendió en 10µl de agua bi-distilada estéril y se incubó a 100°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 14000xg durante 5 minutos y se utilizó una alícuota del sobrenadante como molde en las reacciones de PCR.

2.8. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Los experimentos de agroinfiltración se realizaron en plantas de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas de edad. Los cultivos saturados de *A. tumefaciens* se cosecharon por centrifugación, se diluyeron en agua hasta un valor de DO_{600nm} de 0,1-0,5, dependiendo del cultivo, y se infiltraron en el lado abaxial de la hoja utilizando una jeringa de 1ml sin aguja.

2.9. Extracción de proteínas de tejido vegetal

Inmediatamente después de colectar las hojas, se muele el tejido foliar en N₂ líquido y se homogeneizan 100-200mg del tejido molido en 200 µl de buffer de extracción (75 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 5% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 1,0 mM PMSF) conteniendo un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). Luego se incuba a 4 °C con agitación durante 20 minutos. Se centrifuga a 14000xg por 10 minutos y al sobrenadante se le agrega un volumen de SB 4X (62,5mM Tris-HCl pH6.8; 2% p/v SDS; 10% v/v glicerol; 5% v/v β-mercaptoetanol; 0,001% p/v azul de bromofenol). Las muestras se hierven por 10 minutos y se centrifugan durante 5 minutos a 14000xg para eliminar agregados.

2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectuó utilizando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970) con modificaciones como se describen en *Mini-PROTEAN® Tetra Cell Manual, Bio-Rad, California, EEUU*. Las muestras se sometieron a electroforesis a 100V hasta su entrada en el gel de apilamiento y luego a 150V en el gel de separación. El porcentaje de acrilamida utilizado para los geles de separación varió entre 10% y 14%, de acuerdo al tamaño de las proteínas analizadas.

2.11. Análisis de proteínas por *Western blot*

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Biotech) se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios, California, EEUU) y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones. La transferencia se lleva a cabo a 80V durante 90 minutos en *buffer* de transferencia frío (Tris 5 mM; Gly 38 mM; SDS 0,01%), una vez finalizada, se bloquea la membrana con 5% p/v de leche descremada en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realiza un lavado en TBS durante 5 minutos en agitación suave. Se incuba la membrana *overnight* a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo primario en TBS-T (TBS con el agregado de 0,05% v/v de Tween 20) con 3% p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación. Se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo secundario (anti-ratón-IgG conjugado a HRP, Horseradish Peroxidase) diluido en TBS-T con 3% p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación y un último lavado de 5 minutos en TBS para eliminar las trazas de detergente. Para el revelado de la membrana se preparan las soluciones A (500 µl Tris-HCl 1M pH 8.5; 32 µl de H₂O₂ 30%; 4,468 ml de H₂O bidestilada) y B (500 µl Tris-HCl 1M

pH 8.5; 50 µl de ácido cumárico 90mM; 22 µl de luminol 250mM; 4,428 ml de H₂O bidestilada), se mezclan al momento de utilizarlas y se incuba la membrana por unos segundos, se retiran los restos del sustrato secando la membrana con papel de filtro y se expone a una placa radiográfica durante el tiempo necesario.

2.12. Tinción de geles de poliacrilamida con plata

Para la visualización de las bandas de proteínas de los geles de poliacrilamida de los ensayos de coimmunoprecipitación se utilizó el método de tinción con plata descrito por Blum et al. (1987). Este método de tinción es uno de los más sensibles descritos hasta el momento (límite de detección 0,5-1 ng).

2.13. Co-inmunoprecipitación: GFP-Trap

Para realizar las co-inmunoprecipitaciones se empleó GFP-Trap_A de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Chromotek, Alemania). Se obtuvieron extractos proteicos totales por resuspensión de tejido foliar molido con N₂ líquido en *buffer* de lisis (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% NP-40) conteniendo un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). Luego de 30 minutos de incubación a 4°C con agitación constante, los extractos proteicos fueron centrifugados a 11.000xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró con papel de filtro Whatman para eliminar restos de material vegetal sin moler. Se incubaron 20 ml de cada extracto filtrado con 50µl de esferas de agarosa de GFP-Trap_A previamente equilibradas durante 2 horas a 4°C en agitación continua. Luego se centrifugaron a 2500xg por 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, y las perlas de agarosa se lavaron tres a cuatro veces con *buffer* de dilución (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl).

Para los análisis por SDS-PAGE, se incubaron 2 ml de extracto de proteína total con 15µl de las perlas de GFP-trap_A equilibradas y se procedió del mismo modo. Para liberar las proteínas de las perlas de agarosa, se agregó SB 4X y se incubó a 100 °C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 2000xg por 2 minutos antes de ser utilizadas.

2.14. Análisis proteómico por espectrometría de masas

2.14.1. Digestión triptica *on-beads* de proteínas inmunopurificadas

La reducción, alquilación y digestión con tripsina de las proteínas unidas a las perlas de GFP-trap_A *in situ* (*on-beads*) fueron realizadas en el CEQUIBIEM. Para la reducción y alquilación, las perlas se lavaron dos veces con *buffer* de bicarbonato de amonio 50mM (pH 8), después de lo cual se incubaron durante 1h a 60°C con ditiotreitól 50mM en bicarbonato de amonio 50mM. Posteriormente, se añadió iodoacetamida 50mM en bicarbonato de amonio 50mM y las perlas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante una hora. A continuación, se

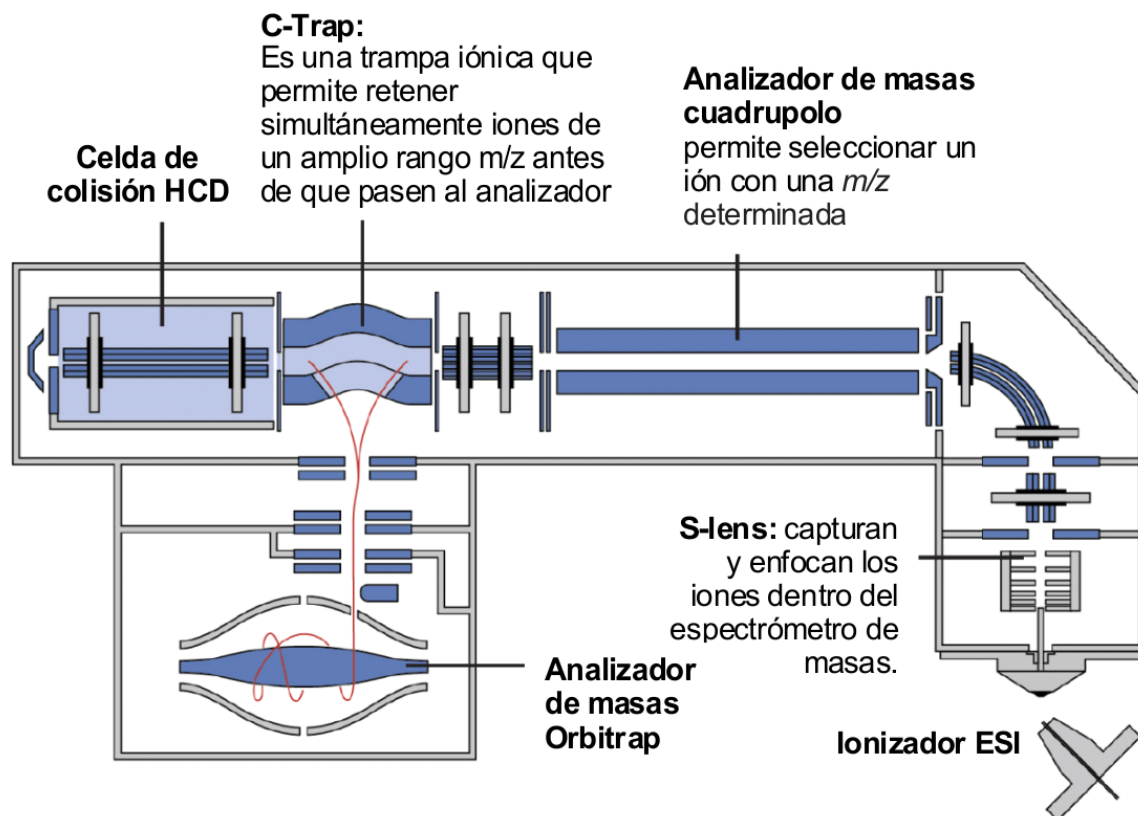
añadió 50mM de Cys y directamente después se añadió a la solución 1µl de solución de tripsina (Roche) (0,5µg, en HCl 1mM). Las perlas se incubaron *overnight* a 20°C, después de lo cual se terminó la digestión añadiendo ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0,5% (v/v). Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se guardó el sobrenadante (péptidos provenientes de la digestión) a -20 °C hasta su análisis.

A los digeridos con tripsina se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y resuspendidas con 10 µl de ácido fórmico 0,1%.

2.14.2. Análisis de proteínas por Orbitrap

Los péptidos tripticos de cada muestra se analizaron por LC-MSMS mediante un nanoHPLC-ESI-Orbitrap, modelo Q-Exactive, marca Thermo Scientific. Este equipo está conformado por un cromatógrafo nanoHPLC (Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000) apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa, acoplado a un espectrómetro de masa que cuenta con un analizador Orbitrap, lo que permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray (ESI) (ionizador marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY) con un voltaje del *spray* de 3,5 kV. Los iones son separados según su *m/z* en el analizador Orbitrap de alta resolución. En este tipo de analizador, los iones giran alrededor de un electrodo central y también se mueven hacia los lados del eje horizontal del electrodo, describiendo orbitas que son dependientes de la relación *m/z*. El equipo cuenta con una celda de colisión HCD (*High Collision Dissociation*), que permite realizar espectros MSMS de iones peptídicos seleccionados. Los iones peptídicos elegidos para realizarles MSMS son seleccionados en un analizador cuadrupolo en el cual se determina qué *m/z* es transmitida, esto se logra aplicando un voltaje de radiofrecuencia que permita a un determinado ión atravesar el analizador. Ese ión seleccionado luego pasa a la celda de colisión HCD y sus productos de fragmentación pasan al analizador orbitrap (previa retención en la C-Trap).

La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MSMS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.



Esquema simplificado de un espectrómetro de masas Orbitrap, Q-Exactive, Thermo Scientific

2.14.3. Análisis de los espectros obtenidos

Los espectros obtenidos se analizaron con el programa *Proteome Discoverer* (Thermo Scientific, versión: 1.4), utilizando la base de datos correspondientes. Se realizó una aproximación cuantitativa con el cálculo del PSM (*peptide-spectrum match*) medio para cada proteína. El valor de PSM de una proteína indica la sumatoria de los PSMs de cada péptido individual que pertenecen a un *hit* determinado. El PSM de cada péptido es el número de veces que se hizo espectro MSMS de ese péptido, valor que está directamente relacionado con la cantidad de ese péptido en la muestra.

Proteome Discoverer Es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (*High/Medium/Low*), utilizándose únicamente los péptidos de nivel *High*.

Se utilizaron los siguientes criterios de búsqueda:

- Base de datos (origen): Secuencia de GFP y 54K:GFP, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana sp.* y *Arabidopsis sp.*
- Enzima: Tripsina
- Miscoleavage: 2
- Tolerancia de masa para precursor: 10 ppm
- Tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da
- Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M)
- Modificaciones estáticas: Carbamidometilación (C)
- Nivel de confianza de los péptidos: High

2.15. Construcción de mutantes de las proteínas de ophiovirus

Los mutantes de las proteínas de los ophiovirus utilizados en este trabajo de tesis se construyeron usando la técnica de *overlapping* PCR con cebadores mutagénicos (ver tabla punto 1.6). Para la amplificación de los fragmentos se utilizaron las enzimas *Pfx* DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) o *Pfu* DNA polimerasa (INBIO Highway). Los fragmentos mutados se clonaron en el vector PCR8/GW/TOPO (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos de entrada resultantes se digirieron con la enzima de restricción *XhoI* y se recombinaron con los vectores de expresión de plantas pB7RWG2.0 y pB7FWG2.0 (Karimi et al., 2002), usando el kit LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. El clonado correcto se confirmó mediante secuenciación de DNA. Los plásmidos recombinantes verificados se transfirieron a la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación.

2.16. Construcción del vector TMV Δ MP Δ CP-GFP para el estudio del movimiento viral célula a célula

El vector viral TMV Δ MP Δ CP-GFP se construyó a partir del plásmido pJL-TRBO-G (Lindbo, 2007). Se eliminó mediante PCR un fragmento de 489 nt correspondiente a las posiciones 57 a 545 de la MP^{TMV} usando *Pfu* DNA polimerasa (INBIO Highway) y los oligonucleótidos pTRBOG Δ MCfw y pTRBOG Δ MCrev (ver tabla punto 1.6). El molde se digirió mediante incubación con DpnI y el producto amplificado de PCR de aproximadamente 11 kpb se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli*. La construcción se verificó mediante secuenciación de DNA y el plásmido se transfirió a la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación.

2.17. Construcción de la quimera RNA3^{CMV}ΔMP::MP^{CPsV} para el estudio del movimiento a larga distancia

La quimera RNA3^{CMV}ΔMP::MP^{CPsV} se construyó a partir del plásmido pCB301-CMVRNA3 (Shen et al., 2014). Usando como molde una minipreparación del plásmido pCB301-CMVRNA3, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 10 Kpb utilizando los cebadores CMVRNA3ΔMP_R y CMVRNA3ΔMP_F (ver tabla punto 1.6) y Platinum™SuperFi™ DNA polimerasa (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (PCR 1). Se realizó una digestión con DpnI para eliminar el plásmido molde y se purificó el producto amplificado con sílica (ver punto 2.5) (molde 1). Luego se amplificó por PCR el ORF de MP^{CPsV} utilizando los cebadores CMVRNA3:54k_F y CMVRNA3:54k_R y la DNA polimerasa *Pfu* (INBIO Highway) (PCR 2). El producto amplificado se purificó con sílica (ver punto 2.5) (molde 2). Finalmente se procedió a la unión de los fragmentos purificados obtenidos en las PCR 1 y PCR 2, mediante una tercera reacción de PCR (sin agregado de cebadores) usando masas aproximadamente iguales de molde 1 y 2 y la enzima Platinum™SuperFi™ DNA polimerasa (Invitrogen). El producto de esta última reacción se transformó en la cepa Top10 de *E. coli*. La construcción se verificó mediante secuenciación de DNA y el plásmido se transfirió a la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación.

2.18. Ensayos de *gating* de plasmodesmos

2.18.1. Ensayo de difusión de GFP citoplasmática

El ensayo de '*gating*' de GFP permite evaluar si existe difusión de monómeros de GFP entre células adyacentes. Estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo descrito previamente por Bayne et al. (2005), con algunas modificaciones. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* completamente desarrolladas con cultivos diluidos de *A. tumefaciens* que llevan el plásmido pGDG a DO_{600nm}=5 x10⁻⁴ final, junto con cultivos que llevan plásmidos binarios para la expresión de la supresora P19 (pBin61-P19) (Voinnet et al., 2003) a DO_{600nm}=0,2, y cultivos que permiten la expresión de la proteína de interés a DO_{600nm}=0,3. Las células fluorescentes se observaron por microscopía a los 3 dpai.

2.18.2. Ensayo de actividad NCAP

Para evaluar la actividad NCAP de las proteínas de interés, las hojas de *N. benthamiana* fueron co-agroinfiltradas con cultivos diluidos de *Agrobacterium* (OD_{600nm} = 5x10⁻⁴) portando el plásmido pGDG (usado como control negativo) o las construcciones para la expresión de las proteínas a ensayar fusionadas a eGFP, junto con un cultivo de *Agrobacterium* portador del plásmido pBin61-P19 (OD_{600nm} = 0,2). El número de focos de fluorescencia y la cantidad de células en cada foco se contaron a 3 dpai por microscopía de fluorescencia.

Se usó la transformación de arcoseno para corregir los datos para la distribución normal de ambos ensayos de *gating*. Las comparaciones entre experimentos independientes para cada proteína analizada se realizaron mediante *one-way* ANOVA (con la prueba post hoc de Tukey, $\alpha = 0,05$).

2.19. Ensayos de transcomplementación del movimiento viral célula a célula de TMV Δ MP Δ CP-GFP

Para los ensayos de transcomplementación de TMV Δ MP Δ CP-GFP, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos diluidos de *A. tumefaciens* que contenían el vector viral TMV Δ MP Δ CP-GFP ($DO_{600nm}=1,0 \times 10^{-5}$) y pBin61-P19 ($DO_{600nm}=0,2$) junto con cultivos de *A. tumefaciens* para la expresión de mRFP como control negativo ($DO_{600nm}=0,3$) o los controles positivos (MP^{CPsV}:mRFP o MP^{MiLBVV}:mRFP) ($DO_{600nm}=0,3$) en una mitad de la hoja, o junto con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones para la expresión de las respectivas proteínas mutadas a ensayar ($DO_{600nm}=0,3$), en la otra mitad. Los focos de infección se analizaron a 4-7 dpai bajo iluminación UV y por microscopía confocal.

2.20. Ensayos de transcomplementación del movimiento viral célula a célula de CMV Δ MP:GFP

Para los ensayos de transcomplementación de CMV Δ MP:GFP, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos diluidos de *A. tumefaciens* que contenían el reportero pRNA3 Δ MP::erGFP ($DO_{600nm}=1,0 \times 10^{-3}$), pRNA1 ($DO_{600nm}=0,5$) y pRNA2 ($DO_{600nm}=0,5$) junto con cultivos de *A. tumefaciens* para la expresión de mRFP como control negativo ($DO_{600nm}=0,5$) o el control positivo pCXS-N-MP^{CMV} ($DO_{600nm}=0,5$) en una mitad de la hoja, o junto con cultivos de *A. tumefaciens* con la construcción para la expresión de la MP^{CPsV} (pB7-MP^{CPsV}:mRFP) ($DO_{600nm}=0,5$), en la otra mitad. Los focos de infección se analizaron a 2-3 dpai por microscopía de epifluorescencia y confocal.

2.21. Ensayos de movimiento viral a larga distancia usando CMV

Para los ensayos de movimiento a larga distancia utilizando el sistema basado en CMV (Shen et al., 2014), se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* wt con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pCB301-CMVRNA1 ($DO_{600nm}=0,35$) y pCB301-CMVRNA2 ($DO_{600nm}=0,35$) junto con un cultivo de *A. tumefaciens* con el plásmido pRNA3 Δ MP::MP^{CPsV} ($DO_{600nm}=0,35$) o los controles pRNA3 Δ MP::erGFP ($DO_{600nm}=0,35$) (control negativo) o pRNA3 ($DO_{600nm}=0,35$) (control positivo). La infección sistémica se analizó por observación de síntomas y RT-PCR de las hojas superiores no agroinfiltradas. Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* en estadio de 4-5 hojas maduras, o plantas de *N. occidentalis* en estadio de 3-4 hojas

maduras. Se agroinfiltró en todos los casos la segunda hoja madura (contando desde el ápice) de plantas de *N. benthamiana* y la primera hoja madura de plantas de *N. occidentalis*.

Para los ensayos de movimiento sistémico de CMV Δ MP::erGFP en la línea 54:06 de *N. benthamiana*, se agroinfiltraron estas plantas con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pCB301-CMVRNA1 (DO_{600nm}=0.35) y pCB301-CMVRNA2 (DO_{600nm}=0.35) junto con un cultivo de *A. tumefaciens* con el plásmido pRNA3 Δ MP::erGFP (DO_{600nm}=0.35) o el control positivo pRNA3 (DO_{600nm}=0.35). Como control negativo se usaron plantas agroinfiltradas únicamente con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pCB301-CMVRNA1 (DO_{600nm}=0.35) y pCB301-CMVRNA2 (DO_{600nm}=0.35). La infección sistémica se analizó por observación de síntomas.

2.22. Ensayos de movimiento viral a larga distancia usando TMV Δ CP:GFP

Para los ensayos de movimiento sistémico de TMV Δ CP:GFP en la línea 48:02 de *N. benthamiana*, las plantas se agroinfiltraron con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo el vector viral pJLTRBO-G (Lindbo, 2007) (DO_{600nm}=0.1). Como control positivo se utilizaron plantas de la línea 48:02 agroinfiltradas con el vector viral pJL24 (Lindbo, 2007) (DO_{600nm}=0.1) y como control negativo plantas de *N. benthamiana* wt agroinfiltradas con pJLTRBO-G. La infección sistémica se analizó por observación de síntomas y fluorescencia de GFP en las hojas superiores.

2.23. Microscopía de fluorescencia

Se empleó un microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse Ti equipado con un filtro para GFP y un objetivo 40X. Para las imágenes de microscopía confocal se empleó un microscopio Leica TCS SP5 II equipado con un objetivo HCX PL APO CS 63.0 x 1.40 UV de inmersión en aceite, con longitudes de onda de excitación y emisión de 488/524–550nm para eGFP y de 543/566–634nm para mRFP. Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

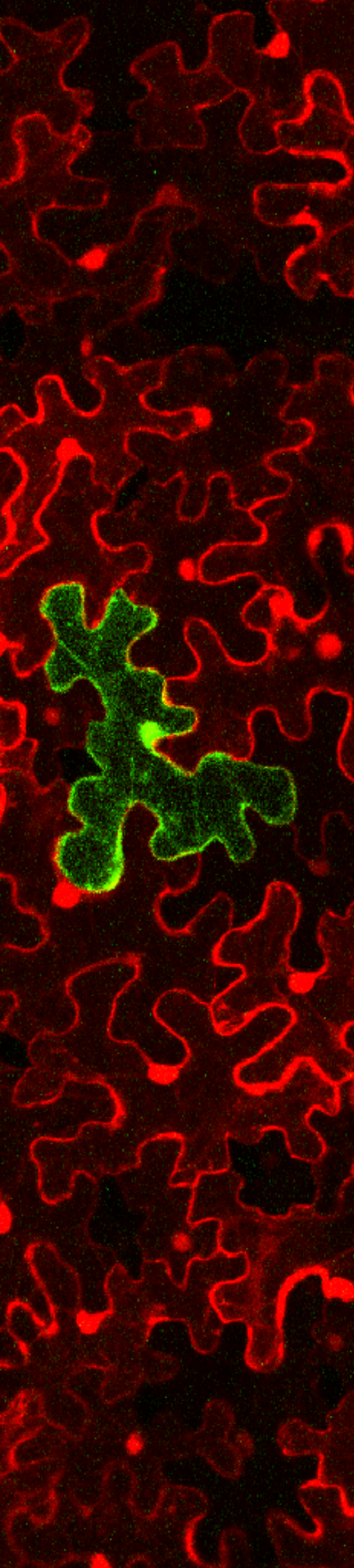
2.24. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de ophiovirus

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software ANNIE (Ooi et al., 2009) para predecir la organización estructural de las proteínas. Para realizar los alineamientos múltiples de las secuencias de *Ophiovirus* se usó Psi-Coffee (Di Tommaso et al., 2011; Taly et al., 2011) y PROMALS (Pei et al., 2007). Los alineamientos se presentaron usando el software Jalview (Waterhouse et al., 2009) con el esquema de coloración de ClustalX (ver Figura 2b y 2d en Procter et al. (2010)) o con coloración en base al porcentaje de identidad de cada residuo alineado, según se indique. La estructura secundaria de las secuencias individuales se predijo utilizando Jpred (Cole et al., 2008), y se verificó en el contexto de alineamientos múltiples utilizando PROMALS (Pei et al., 2007). Las regiones desordenadas se predijeron con

MetaDisorder (Kozlowski and Bujnicki, 2012), de acuerdo con los principios descritos en Ferron et al. (2006).

Para la detección de homología remota se utilizó el método de comparación *profile-sequence* Psi-Blast (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) y los métodos de comparación *profile-profile* HHblits (Remmert et al., 2012) y HHpred (Hildebrand et al., 2009), como se describe en Kuchibhatla et al. (2014), contra las bases de datos de PFAM, versión 30 (Finn et al., 2016), con un corte estándar de *E-value* de 10^{-3} . Se utilizó HAlign (Biegert et al., 2006) para validar los potenciales homólogos mediante la comparación por pares, con un *E-value* de corte de 10^{-3} .

Los modelados de las proteínas de CPsV se realizaron con los software MUSTER (Wu y Zhang, 2008) e I-TASSER (Yang et al., 2015). La validación de los mismos se llevó a cabo con Verify_3D (Bowie, et al., 1991; Luethy, et al., 1992) y ProSA (Wiederstein y Sippl, 2007). Los modelados se presentan usando el software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Afroz, A., Ali, G.M., Mir, A., Komatsu, S., 2011. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. *Plant Cell Rep* 30, 745-763.
- Ahlquist, P., French, R., Janda, M., Loesch-Fries, L.S., 1984. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7066-7070.
- Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B., Dye, B.T., 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77, 8181-8186.
- Alamillo, J.M., Saenz, P., Garcia, J.A., 2006. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* 48, 217-227.
- Alazem, M., Lin, K.Y., Lin, N.S., 2014. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of Bamboo mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 177-189.
- Alazem, M., Lin, N.S., 2015. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol Plant Pathol* 16, 529-540.
- Alcaide-Loridan, C., Jupin, I., 2012. Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol* 160, 72-82.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Alzhanova, D.V., Napuli, A.J., Creamer, R., Dolja, V.V., 2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J* 20, 6997-7007.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C.L., Heinlein, M., Mely, Y., Maule, A.J., Ritzenthaler, C., 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* 6, e1001119.
- Amari, K., Di Donato, M., Dolja, V.V., Heinlein, M., 2014. Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus. *PLoS Pathog* 10, e1004448.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V.V., Ritzenthaler, C., 2011. Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog* 7, e1002327.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13079-13084.
- Andreev, I.A., Hyon Kim, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Fitzgerald, A.G., Palukaitis, P., Talianky, M.E., 2004. Molecular interactions between a plant virus movement protein and RNA: force spectroscopy investigation. *J Mol Biol* 339, 1041-1047.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., Randall, R.E., 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17264-17269.
- Angel, C.A., Lutz, L., Yang, X., Rodriguez, A., Adair, A., Zhang, Y., Leisner, S.M., Nelson, R.S., Schoelz, J.E., 2013. The P6 protein of Cauliflower mosaic virus interacts with CHUP1, a plant protein which moves chloroplasts on actin microfilaments. *Virology* 443, 363-374.
- Aparicio, F., Pallas, V., Sanchez-Navarro, J., 2010. Implication of the C terminus of the Prunus necrotic ringspot virus movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *J Gen Virol* 91, 1865-1870.
- Aqil, M., Naqvi, A.R., Bano, A.S., Jameel, S., 2013. The HIV-1 Nef protein binds argonaute-2 and functions as a viral suppressor of RNA interference. *PLoS One* 8, e74472.
- Ascencio-Ibanez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.J., Chu, T.M., Wolfinger, R.D., Cella, R., Hanley-Bowdoin, L., 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes

- impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* 148, 436-454.
- Assaad, F.F., Tucker, K.L., Signer, E.R., 1993. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 22, 1067-1085.
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P., Beachy, R.N., 1991. The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J Gen Virol* 72 (Pt 1), 209-211.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V., 2008a. Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *J Virol* 82, 2836-2843.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2008b. Myosin XI-K Is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 146, 1098-1108.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., Voinnet, O., 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24, 904-915.
- Baliji, S., Lacatus, G., Sunter, G., 2010. The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes. *Virology* 402, 238-247.
- Baluska, F., Cvrckova, F., Kendrick-Jones, J., Volkmann, D., 2001. Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol* 126, 39-46.
- Baluska, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, J., Chua, N.H., Barlow, P.W., Volkmann, D., 2000. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol* 227, 618-632.
- Baluska, F., Samaj, J., Napier, R., Volkmann, D., 1999. Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J* 19, 481-488.
- Barcala Tabarrozzi, A.E., Peña, E.J., Dal Bo, E., Robles Luna, G., Reyes, C.A., Garcia, M.L., 2010. Identification of Mirafiori lettuce big-vein virus and Lettuce big-vein associated virus infecting *Lactuca sativa* with symptoms of lettuce big-vein disease in Argentina. *Plant Pathology* 59, 1160-1161.
- Bari, R., Jones, J.D., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69, 473-488.
- Barneche, F., Steinmetz, F., Echeverria, M., 2000. Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 275, 27212-27220.
- Baron-Epel, O., Hernandez, D., Jiang, L.W., Meiners, S., Schindler, M., 1988. Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. *J Cell Biol* 106, 715-721.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bassett, C.L., 2012. Cajal bodies and plant RNA metabolism. *Crit Rev in Plant Sci* 31, 258-270.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C., 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11928-11933.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D.C., 2005. Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44, 471-482.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N., Asurmendi, S., 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12157-12162.
- Beclin, C., Berthome, R., Palauqui, J.C., Tepfer, M., Vaucheret, H., 1998. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 252, 313-317.

- Bednenko, J., Noto, T., DeSouza, L.V., Siu, K.W., Pearlman, R.E., Mochizuki, K., Gorovsky, M.A., 2009. Two GW repeat proteins interact with *Tetrahymena thermophila* argonaute and promote genome rearrangement. *Mol Cell Biol* 29, 5020-5030.
- Beffa, R.S., Hofer, R.M., Thomas, M., Meins, F., Jr., 1996. Decreased Susceptibility to Viral Disease of [beta]-1,3-Glucanase-Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *Plant Cell* 8, 1001-1011.
- Beijerinck, M.W., 1898. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Phytopathological Classics* 7, 33-52.
- Belin, C., Schmitt, C., Gaire, F., Walter, B., Demangeat, G., Pinck, L., 1999. The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *J Gen Virol* 80 (Pt 6), 1347-1356.
- Bell, K., Oparka, K., 2011. Imaging plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 9-25.
- Benitez-Alfonso, Y., Cantrill, L., Jackson, D., 2006. Plasmodesmata: Cell-Cell Channels in Plants, Cell-Cell Channels. Springer New York, pp. 101-112.
- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., Jackson, D., 2009. Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3615-3620.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., Maule, A.J., 2010. Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 1403-1412.
- Benitez-Alfonso, Y., Jackson, D., 2009. Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in Arabidopsis meristems. *Plant Signal Behav* 4, 655-659.
- Berna, A., Gafny, R., Wolf, S., Lucas, W.J., Holt, C.A., Beachy, R.N., 1991. The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182, 682-689.
- Bertens, P., Wellink, J., Goldbach, R., van Kammen, A., 2000. Mutational analysis of the cowpea mosaic virus movement protein. *Virology* 267, 199-208.
- Beven, A.F., Simpson, G.G., Brown, J.W., Shaw, P.J., 1995. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J Cell Sci* 108 (Pt 2), 509-518.
- Bhat, S., Folimonova, S.Y., Cole, A.B., Ballard, K.D., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W., Nelson, R.S., 2013. Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement. *Plant Physiol* 161, 134-147.
- Bhattacharyya, D., Chakraborty, S., 2017. Chloroplast: the Trojan horse in plant-virus interaction. *Mol Plant Pathol*.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Soding, J., Lupas, A.N., 2006. The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, W335-339.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bivalkar-Mehla, S., Vakharia, J., Mehla, R., Abreha, M., Kanwar, J.R., Tikoo, A., Chauhan, A., 2011. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res* 155, 1-9.
- Blackman, L.M., Boevink, P., Cruz, S.S., Palukaitis, P., Oparka, K.J., 1998. The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* 10, 525-538.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34, 6233-6246.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Blum, H., Gross, H.J., Beier, H., 1989. The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin. *Virology* 169, 51-61.

- Boatwright, J.L., Pajerowska-Mukhtar, K., 2013. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol Plant Pathol* 14, 623-634.
- Boccard, F., Baulcombe, D., 1993. Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* 193, 563-578.
- Boerjan, W., Bauw, G., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* 6, 1401-1414.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., Cullen, B.R., 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16, 4207-4214.
- Boonham, N., Tomlinson, J., Mumford, R., 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 45, 307-328.
- Bos, L., Huijberts, N., 1990. Screening for resistance to big-vein disease of lettuce (*Lactuca sativa*) *Crop Prot.* 9, 446-452.
- Bos, L., Huijberts, N., 1996. Lettuce ring necrosis, caused by a chytrid-borne agent distinct from *Lettuce big-vein virus*. *European Journal of Plant Pathology* 102, 867-873.
- Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D., 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P., Heinlein, M., 2000. Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat Cell Biol* 2, 826-832.
- Boyko, V., Hu, Q., Seemanpillai, M., Ashby, J., Heinlein, M., 2007. Validation of microtubule-associated Tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. *Plant J* 51, 589-603.
- Boyle, S.M., Ruvolo, V., Gupta, A.K., Swaminathan, S., 1999. Association with the cellular export receptor CRM 1 mediates function and intracellular localization of Epstein-Barr virus SM protein, a regulator of gene expression. *J Virol* 73, 6872-6881.
- Brandner, K., Sambade, A., Boutant, E., Didier, P., Mely, Y., Ritzenthaler, C., Heinlein, M., 2008. Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein-tagged microtubule end-binding protein 1. *Plant Physiol* 147, 611-623.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D.C., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17, 6739-6746.
- Bucher, G.L., Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F., Jr., Iglesias, V.A., 2001. Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J* 28, 361-369.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Burgan, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 16, 265-272.
- Campbell, R.N., 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34, 87-108.
- Canetta, E., Kim, S.H., Kalinina, N.O., Shaw, J., Adya, A.K., Gillespie, T., Brown, J.W., Taliansky, M., 2008. A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, in vitro. *J Mol Biol* 376, 932-937.
- Canto, T., Palukaitis, P., 1999a. Are tubules generated by the 3a protein necessary for cucumber mosaic virus movement? *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 985-993.
- Canto, T., Palukaitis, P., 1999b. The hypersensitive response to cucumber mosaic virus in *Chenopodium amaranticolor* requires virus movement outside the initially infected cell. *Virology* 265, 74-82.
- Canto, T., Prior, D.A., Hellwald, K.H., Oparka, K.J., Palukaitis, P., 1997. Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237, 237-248.
- Cantrill, L.C., Overall, R.L., Goodwin, P.B., 2001. Changes in symplastic permeability during adventitious shoot regeneration in tobacco thin cell layers. *Planta* 214, 206-214.

- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M.G., Simon, A.E., Morris, T.J., Qu, F., 2010. The capsid protein of Turnip crinkle virus overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in Arabidopsis. *J Virol* 84, 7793-7802.
- Caplan, J.L., Kumar, A.S., Park, E., Padmanabhan, M.S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S.P., 2015. Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Dev Cell* 34, 45-57.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S.P., 2008. Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* 132, 449-462.
- Carbonell, A., Carrington, J.C., 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr Opin Plant Biol* 27, 111-117.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I., 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2, E107-112.
- Carrington, J.C., Ambros, V., 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., Schaad, M.C., 1996. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* 8, 1669-1681.
- Carvalho, C.M., Wellink, J., Ribeiro, S.G., Goldbach, R.W., Van Lent, J.W., 2003. The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *J Gen Virol* 84, 2271-2277.
- Cedano, J., Aloy, P., Perez-Pons, J.A., Querol, E., 1997. Relation between amino acid composition and cellular location of proteins. *J Mol Biol* 266, 594-600.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., Zambryski, P., 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60, 637-647.
- Citovsky, V., McLean, B.G., Zupan, J.R., Zambryski, P., 1993. Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev* 7, 904-910.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Prasad, B.V., Zambryski, P., 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* 4, 397-411.
- Cleland, R.E., Fujiwara, T., Lucas, W.J., 1994. Plasmodesmal-mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress. *Protoplasma* 178, 81-85.
- Cokol, M., Nair, R., Rost, B., 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 1, 411-415.
- Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J., 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 36, W197-201.
- Collier, S., Pendle, A., Boudonck, K., van Rij, T., Dolan, L., Shaw, P., 2006. A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* 17, 2942-2951.
- Correa, R.L., Bruckner, F.P., de Souza Cascardo, R., Alfenas-Zerbini, P., 2013. The Role of F-Box Proteins during Viral Infection. *Int J Mol Sci* 14, 4030-4049.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., Laliberte, J.F., 2009. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J Virol* 83, 10460-10471.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., Turner, D.S., 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385, 781-782.
- Crawford, K.M., Zambryski, P.C., 2000. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol* 10, 1032-1040.
- Crawford, K.M., Zambryski, P.C., 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* 125, 1802-1812.
- Craxton, M., 2004. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* 5, 43.
- Craxton, M., 2007. Evolutionary genomics of plant genes encoding N-terminal-TM-C2 domain proteins and the similar FAM62 genes and synaptotagmin genes of metazoans. *BMC Genomics* 8, 259.

- Cros, J.F., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 6, 205-213.
- Csorba, T., Kontra, L., Burgyan, J., 2015. viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480, 85-103.
- Culver, J.N., Dawson, W.O., 1989. Tobacco mosaic virus coat protein: an elicitor of the hypersensitive reaction but not required for the development of mosaic symptoms in *Nicotiana sylvestris*. *Virology* 173, 755-758.
- Culver, J.N., Padmanabhan, M.S., 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol* 45, 221-243.
- Chang, C.H., Hsu, F.C., Lee, S.C., Lo, Y.S., Wang, J.D., Shaw, J., Taliansky, M., Chang, B.Y., Hsu, Y.H., Lin, N.S., 2016. The Nucleolar Fibrillarin Protein Is Required for Helper Virus-Independent Long-Distance Trafficking of a Subviral Satellite RNA in Plants. *Plant Cell* 28, 2586-2602.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., Carrington, J.C., 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18, 1179-1186.
- Chen, H., Ahmad, M., Rim, Y., Lucas, W.J., Kim, J.Y., 2013. Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *New Phytol* 198, 1250-1260.
- Chen, H., Jackson, D., Kim, J.Y., 2014. Identification of evolutionarily conserved amino acid residues in homeodomain of KNOX proteins for intercellular trafficking. *Plant Signal Behav* 9, e28355.
- Chen, L., Liao, G., Fujimuro, M., Semmes, O.J., Hayward, S.D., 2001. Properties of two EBV Mta nuclear export signal sequences. *Virology* 288, 119-128.
- Chen, M.H., Citovsky, V., 2003. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J* 35, 386-392.
- Chen, M.H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K., Citovsky, V., 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 19, 913-920.
- Chen, M.H., Tian, G.W., Gafni, Y., Citovsky, V., 2005. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol* 138, 1866-1876.
- Chen, X., 2005. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* 579, 5923-5931.
- Chen, X., 2010. Plant microRNAs at a glance. *Semin Cell Dev Biol* 21, 781.
- Cheng, C.P., Tzafrir, I., Lockhart, B.E., Olszewski, N.E., 1998. Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina* yellow mottle badnavirus. *J Gen Virol* 79 (Pt 4), 925-929.
- Cheng, S.F., Tsai, M.S., Huang, C.L., Huang, Y.P., Chen, I.H., Lin, N.S., Hsu, Y.H., Tsai, C.H., Cheng, C.P., 2013. Ser/Thr kinase-like protein of *Nicotiana benthamiana* is involved in the cell-to-cell movement of Bamboo mosaic virus. *PLoS One* 8, e62907.
- Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L., Carrington, J.C., 2000. Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 489-494.
- Chisholm, S.T., Parra, M.A., Anderberg, R.J., Carrington, J.C., 2001. *Arabidopsis* RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* 127, 1667-1675.
- Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C., Tsai, C.H., 2010. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* 11, 641-649.
- Choi, H., Cho, W.K., Kim, K.H., 2016. Two homologous host proteins interact with potato virus X RNAs and CPs and affect viral replication and movement. *Sci Rep* 6, 28743.
- Chou, K.C., 2001. Prediction of protein cellular attributes using pseudo-amino acid composition. *Proteins* 43, 246-255.
- Chou, K.C., 2004. Structural bioinformatics and its impact to biomedical science. *Curr Med Chem* 11, 2105-2134.
- Chou, K.C., Elrod, D.W., 1999. Protein subcellular location prediction. *Protein Eng* 12, 107-118.

- Chou, K.C., Shen, H.B., 2007. Recent progress in protein subcellular location prediction. *Anal Biochem* 370, 1-16.
- Christov, I., Stefanov, D., Velinov, T., Goltsev, V., Georgieva, K., Abracheva, P., Genova, Y., Christov, N., 2007. The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *J Plant Physiol* 164, 1124-1133.
- D'Onghia, A.M., Djelouah, K., Alioto, K.M., Castellano, A., Savino, V., 1998. Elisa correlates with biological indexing for the detection of *Citrus psorosis virus* associated virus. *J Plant Pathol* 80, 157-163.
- de Castro, E., Sigrist, C.J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34, W362-365.
- de Ronde, D., Pasquier, A., Ying, S., Butterbach, P., Lohuis, D., Kormelink, R., 2014. Analysis of Tomato spotted wilt virus NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Mol Plant Pathol* 15, 185-195.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71.
- Deom, C.M., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J., Beachy, R.N., 1991. Altered function of the tobacco mosaic virus movement protein in a hypersensitive host. *Virology* 180, 251-256.
- Derrick, K.S., Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Nguyen, T.K., 1988. Two components associated with the Citrus ringspot virus., in: L. W. Timmer, G., S. M. and Navarro, L. (Ed.), *Proc10 th Conf IOCV*, Riverside, California, USA., pp. 340-342.
- Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W., Scholthof, H.B., 2002. A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol* 129, 1521-1532.
- Desvoyes, B., Scholthof, H.B., 2002. Host-dependent recombination of a Tomato bushy stunt virus coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology* 304, 434-442.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitz, M., Montanyola, A., Chang, J.M., Taly, J.F., Notredame, C., 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39, W13-17.
- Diaz-Pendon, J.A., Ding, S.W., 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 46, 303-326.
- Dielen, A.S., Sasaki, F.T., Walter, J., Michon, T., Menard, G., Pagny, G., Krause-Sakate, R., Maia Ide, G., Badaoui, S., Le Gall, O., Candresse, T., German-Retana, S., 2011. The 20S proteasome alpha5 subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. *Mol Plant Pathol* 12, 137-150.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N., Lucas, W.J., 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4, 915-928.
- Ding, B., Itaya, A., Woo, Y., 1999. Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *Int Rev Cytol* 190, 251-316.
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P., Lucas, W.J., 1995. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* 207, 345-353.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., Han, M., 2005. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19, 437-447.
- Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Ding, X., Shintaku, M.H., Carter, S.A., Nelson, R.S., 1996. Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11155-11160.

- Ding, X.S., Carter, S.A., Deom, C.M., Nelson, R.S., 1998. Tobamovirus and Potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiol.* 116, 125–136.
- Doering-Saad, C., Newbury, H.J., Bale, J.S., Pritchard, J., 2002. Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot* 53, 631–637.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A., Carrington, J.C., 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007–1016.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., Carrington, J.C., 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* 13, 1482–1491.
- Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A., Llave, C., 2009. Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* 392, 203–214.
- Donnelly, M., Elliott, G., 2001. Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J Virol* 75, 2566–2574.
- Dorokhov, Y.L., Makinen, K., Frolova, O.Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Atabekov, J.G., Saarma, M., 1999. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett* 461, 223–228.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127–6145.
- Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O., 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet* 38, 258–263.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235–1250.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328, 912–916.
- Dunoyer, P., Voinnet, O., 2005. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr Opin Plant Biol* 8, 415–423.
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42, 185–209.
- Earley, K., Smith, M., Weber, R., Gregory, B., Poethig, R., 2010. An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence* 1, 15.
- Eckardt, N.A., 2003. ATM to the rescue: repairing DNA damage. *Plant Cell* 15, 1–3.
- Ehlers, K., Binding, H., Kollmann, R., 1999. The formation of symplasmic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* 209, 181–192.
- Ehlers, K., Kollmann, R., 2001. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* 216, 1–30.
- El-Manzalawy, Y., Abbas, M., Malluhi, Q., Honavar, V., 2016. FastRNABindR: Fast and Accurate Prediction of Protein-RNA Interface Residues. *PLoS One* 11, e0158445.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., Lagrange, T., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21, 2539–2544.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005–1016.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G., 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8, 978–984.
- Epel, B.L., 2009. Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases. *Semin Cell Dev Biol* 20, 1074–1081.

- Epel, B.L., Erlanger, M.A., 1991. Light regulates symplastic communication in etiolated corn seedlings. *Physiol Plant* 83, 149–153.
- Erwee, M.G., Goodwin, P.B., 1985. Symplast domains in extrastelar tissues of *Egeria densa* Planch. *Planta* 163, 9-19.
- Eulalio, A., Tritschler, F., Izaurralde, E., 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 15, 1433-1442.
- Fang, Y., Spector, D.L., 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr Biol* 17, 818-823.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. Virus taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. , in: Press, E.A. (Ed.), San Diego, CA, p. 1259.
- Feng, L., Duan, C.G., Guo, H.S., 2013. Inhibition of in vivo Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Mol Plant Pathol* 14, 617-622.
- Fernandez-Calvino, L., Martinez-Priego, L., Szabo, E.Z., Guzman-Benito, I., Gonzalez, I., Canto, T., Lakatos, L., Llave, C., 2016. Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds ARGONAUTE 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes. *J Gen Virol* 97, 246-257.
- Ferron, F., Longhi, S., Canard, B., Karlin, D., 2006. A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins* 65, 1-14.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279-285.
- Fischer, U., Droge-Laser, W., 2004. Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 1162-1171.
- Flores, R., Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sanchez-Navarro, J., Fagoaga, C., Lopez, C., Navarro, L., Moreno, P., Pena, L., 2013. Citrus tristeza virus p23: a unique protein mediating key virus-host interactions. *Front Microbiol* 4, 98.
- Freitas, N., Cunha, C., 2009. Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics* 10, 550-557.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S., 2003. TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 132-140.
- Fu, S.-C., Huang, H.-C., Horton, P., Juan, H.-F., 2013. ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic Acids Research* 41, D338-D343.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y., Watanabe, Y., 2007. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 48, 1243-1253.
- Fujiwara, T., Giesman-Cookmeyer, D., Ding, B., Lommel, S.A., Lucas, W.J., 1993. Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus Movement Protein. *Plant Cell* 5, 1783-1794.
- Fusaro, A.F., Correa, R.L., Nakasugi, K., Jackson, C., Kawchuk, L., Vaslin, M.F., Waterhouse, P.M., 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426, 178-187.
- Gall, J.G., 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.
- Gall, J.G., 2003. The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 975-980.
- Gall, J.G., Tsvetkov, A., Wu, Z., Murphy, C., 1995. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? *Dev Genet* 16, 25-35.
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J., Hall, M.N., 1991. Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta* 1071, 83-101.
- Garcia, M.L., Dal Bo, E., Grau, O., Milne, R.G., 1994. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol* 75 (Pt 12), 3585-3590.

- Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A.G., Toth, R., Valentine, T., Chapman, S., Oparka, K.J., 2002. Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14, 1207-1222.
- Giner, A., Lakatos, L., Garcia-Chapa, M., Lopez-Moya, J.J., Burgyan, J., 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* 6, e1000996.
- Gisel, A., Barella, S., Hempel, F.D., Zambryski, P.C., 1999. Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development* 126, 1879-1889.
- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R.E., Bechor-Shental, D., Martz, E., Ben-Tal, N., 2003. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics* 19, 163-164.
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P., Canto, T., 2010. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 294-303.
- Goodin, M.M., Dietzgen, R.G., Schichnes, D., Ruzin, S., Jackson, A.O., 2002. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J.* 31, 375-383.
- Gopinath, K., Kao, C.C., 2007. Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 19, 1179-1191.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Masuta, C., 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 48, 1050-1060.
- Gottwald, T.R., Palle, S.R., Miao, H., Seyran, M., Skaria, M., da Graca, J.V., 2005. Assessment of the possibility of natural spread of citruspsorosis disease. , 16th International Organization of Citrus Virologists (IOCV) Conference, Riverside, pp. 240-250.
- Greber, U.F., Way, M., 2006. A superhighway to virus infection. *Cell* 124, 741-754.
- Greco, A., 2009. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* 19, 201-214.
- Grimsley, N., 1995. Agroinfection. *Methods Mol Biol* 44, 325-342.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., Walden, R., 1986. "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3282-3286.
- Grover, V., Pierce, M.L., Hoyt, P., Zhang, F., Melcher, U., 2010. Oligonucleotide-based microarray for detection of plant viruses employing sequence-independent amplification of targets. *J Virol Methods* 163, 57-67.
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A., Epel, B.L., 2008. Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 335-345.
- Guiu-Aragones, C., Sanchez-Pina, M.A., Diaz-Pendon, J.A., Pena, E.J., Heinlein, M., Martin-Hernandez, A.M., 2016. cmv1 is a gate for Cucumber mosaic virus transport from bundle sheath cells to phloem in melon. *Mol Plant Pathol* 17, 973-984.
- Gunasinghe, U., Berger, P., 1991. Association of potato virus Y gene products with chloroplasts in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 4, 452-457.
- Guo, H.S., Ding, S.W., 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21, 398-407.
- Gutierrez, C., 1999. Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 56, 313-329.
- Hall, A.E., Loomis, R.S., 1972. An Explanation for the Difference in Photosynthetic Capabilities of Healthy and Beet Yellows Virus-infected Sugar Beets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol* 50, 576-580.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., Fang, R., 2012. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* 69, 104-115.

- Hammerschmid, M., Palmeri, D., Ruhl, M., Jaksche, H., Weichselbraun, I., Bohnlein, E., Malim, M.H., Hauber, J., 1994. Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J Virol* 68, 7329-7335.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L., Fedoroff, N., 2004. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1093-1098.
- Harries, P., Ding, B., 2011. Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411, 237-243.
- Harries, P.A., Nelson, R.S., 2008. Movement of Viruses in Plants, in: Regenmortel, B.W.J.M.a.M.H.V.V. (Ed.), *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Ltd, Oxford, pp. 348-355.
- Harries, P.A., Palanichelvam, K., Yu, W., Schoelz, J.E., Nelson, R.S., 2009a. The cauliflower mosaic virus protein P6 forms motile inclusions that traffic along actin microfilaments and stabilize microtubules. *Plant Physiol* 149, 1005-1016.
- Harries, P.A., Park, J.W., Sasaki, N., Ballard, K.D., Maule, A.J., Nelson, R.S., 2009b. Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17594-17599.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E., Nelson, R.S., 2010. Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 1381-1393.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J., 2005. Another quarter century of great progress in understanding the biological properties of plant viruses. *Ann. Appl. Biol.* 146, 15-37.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Harvey, J.J., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstadt, S., Carr, J.P., Baulcombe, D.C., 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6, e14639.
- Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J., Torrance, L., 2005a. Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* 17, 164-181.
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S.H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M.A., Barker, H., Taliansky, M., 2005b. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol* 86, 2891-2896.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., Burgyan, J., 2003. In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 77, 6082-6086.
- Havelda, Z., Maule, A.J., 2000. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* 12, 1975-1986.
- He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H., Zhu, J.K., 2009. An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498-508.
- Heinlein, M., 2015. Plasmodesmata: channels for viruses on the move. *Methods Mol Biol* 1217, 25-52.
- Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., Beachy, R.N., 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270, 1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L., Beachy, R.N., 1998. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* 10, 1107-1120.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M., Sonnewald, U., 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol Plant Pathol* 1, 51-59.
- Heung, L.J., Del Poeta, M., 2005. Unlocking the DEAD-box: a key to cryptococcal virulence? *J Clin Invest* 115, 593-595.

- Hildebrand, A., Remmert, M., Biegert, A., Soding, J., 2009. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins* 77 Suppl 9, 128-132.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Revers, F., 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* 4, 154.
- Hiraguri, A., Ueki, S., Kondo, H., Nomiya, K., Shimizu, T., Ichiki-Uehara, T., Omura, T., Sasaki, N., Nyunoya, H., Sasaya, T., 2013. Identification of a movement protein of Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus. *J. Gen. Virol.* 94, 1145-1150.
- Hiscox, J.A., 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5, 119-127.
- Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A., Heinlein, M., 2009. Inhibition of tobacco mosaic virus movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol* 149, 1810-1823.
- Hofmann, C., Sambade, A., Heinlein, M., 2007. Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA. *Biochem Soc Trans* 35, 142-145.
- Holdaway-Clarke, T.L., Walker, N.A., Hepler, P.K., Overall, R.L., 2000. Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta* 210, 329-335.
- Holt, C.A., Beachy, R.N., 1991. In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* 181, 109-117.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35, W585-587.
- Huang, Y.W., Geng, Y.F., Ying, X.B., Chen, X.Y., Fang, R.X., 2005. Identification of a movement protein of rice yellow stunt rhabdovirus. *J Virol* 79, 2108-2114.
- Huh, S.U., Paek, K.H., 2013. Plant RNA binding proteins for control of RNA virus infection. *Front Physiol* 4, 397.
- Huijberts, N., Blystad, D.R., Bos, L., 1990. Lettuce big-vein virus: Mechanical transmission and relationships to tobacco stunt virus. *Ann. Appl. Biol.* 116, 463-475.
- Hull, R., 2014a. Genome Composition, Organization, and Expression, *Plant Virology Academic Press*, pp. 247-339.
- Hull, R.J., 2014b. Movement of viruses within plants, in: Minihane, C.a.M., C. (Ed.), *Plant Virology. Academic Press, San Diego, CA*, pp. 531-603.
- Hyodo, K., Okuno, T., 2014. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *J. Gen. Plant Pathol.* 80, 123-135.
- Iglesias, V.A., Meins, F., 2000. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J* 21, 157-166.
- Incarbone, M., Dunoyer, P., 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci* 18, 382-392.
- Jackson, D., 2000. Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Curr Opin Plant Biol* 3, 394-399.
- Jacquemond, M., 2012. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res* 84, 439-504.
- Jagger, I.C., Chandler, N., 1934. Big vein, a disease of Lettuce. *Phytopathology* 24, 1253-1256.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Jeffrey, J.L., Poona, W., Petty, I.T., 1996. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology* 223, 208-218.
- Jiang, Y., Li, Z., Nagy, P.D., 2010. Nucleolin/Nsr1p binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology* 396, 10-20.
- Jin, H., Li, S., Villegas, A., Jr., 2006. Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiol* 142, 651-661.
- Jin, Y.H., Niu, B., Feng, K.Y., Lu, W.C., Cai, Y.D., Li, G.Z., 2008. Predicting subcellular localization with AdaBoost Learner. *Protein Pept Lett* 15, 286-289.

- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.
- Jorin, J.V., Maldonado, A.M., Castillejo, M.A., 2007. Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics* 7, 2947-2962.
- Kahn, T.W., Lapidot, M., Heinlein, M., Reichel, C., Cooper, B., Gafny, R., Beachy, R.N., 1998. Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. *Plant J* 15, 15-25.
- Kaido, M., Abe, K., Mine, A., Hyodo, K., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Mise, K., Okuno, T., 2014. GAPDH--a recruits a plant virus movement protein to cortical virus replication complexes to facilitate viral cell-to-cell movement. *PLoS Pathog* 10, e1004505.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T., Helm, J.M., 2008. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* 100, 13-26.
- Kalland, K.H., Szilvay, A.M., Brokstad, K.A., Saetrevik, W., Haukenes, G., 1994. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol Cell Biol* 14, 7436-7444.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R., 2003. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* 4, 383-391.
- Kaplan, I.B., Shintaku, M.H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L.E., Palukaitis, P., 1995. Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* 209, 188-199.
- Kaplan, I.B., Zhang, L., Palukaitis, P., 1998. Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology* 246, 221-231.
- Karcher, R.L., Deacon, S.W., Gelfand, V.I., 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* 12, 21-27.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A., 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7, 193-195.
- Karlowski, W.M., Zielezinski, A., Carrere, J., Pontier, D., Lagrange, T., Cooke, R., 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 38, 4231-4245.
- Karpova, O.V., Zayakina, O.V., Arkhipenko, M.V., Sheval, E.V., Kiselyova, O.I., Poljakov, V.Y., Yaminsky, I.V., Rodionova, N.P., Atabekov, J.G., 2006. Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary 'coat protein-RNA-movement protein' complexes. *J. Gen. Virol.* 87, 2731-2740.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA uncton. *Dev Cell* 4, 205-217.
- Kasteel, D.T., Perbal, M.C., Boyer, J.C., Wellink, J., Goldbach, R.W., Maule, A.J., van Lent, J.W., 1996. The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2857-2864.
- Kasteel, D.T., van der Wel, N.N., Jansen, K.A., Goldbach, R.W., van Lent, J.W., 1997. Tubule-forming capacity of the movement proteins of alfalfa mosaic virus and brome mosaic virus. *J Gen Virol* 78 (Pt 8), 2089-2093.
- Kawakami, S., Watanabe, Y., Beachy, R.N., 2004. Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6291-6296.
- Kelley, W.L., 1999. Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol* 9, R305-308.
- Kim, I., Cho, E., Crawford, K., Hempel, F.D., Zambryski, P.C., 2005a. Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2227-2231.

- Kim, I., Hempel, F.D., Sha, K., Pflugger, J., Zambryski, P.C., 2002. Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 129, 1261-1272.
- Kim, I., Kobayashi, K., Cho, E., Zambryski, P.C., 2005b. Subdomains for transport via plasmodesmata corresponding to the apical-basal axis are established during *Arabidopsis* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11945-11950.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., Jackson, D., 2003. Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 130, 4351-4362.
- Kim, S.H., Kalinina, N.O., Andreev, I., Ryabov, E.V., Fitzgerald, A.G., Taliansky, M.E., Palukaitis, P., 2004. The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *J Gen Virol* 85, 221-230.
- Kim, S.H., Macfarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W., Taliansky, M., 2007a. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11115-11120.
- Kim, S.H., Ryabov, E.V., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J.W., Taliansky, M., 2007b. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* 26, 2169-2179.
- Kim, V.N., Nam, J.W., 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22, 165-173.
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., 2011. *Virus Taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, London, p. 1248.
- Kitajima, E.W., Lauritis, J.A., 1969. Plant virions in plasmodesmata. *Virology* 37, 681-685.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Ryabov, E.V., Dolja, V.V., 1991. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 12), 2895-2903.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., Haenni, A.L., 2011. Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res.* 162, 184-202.
- Kotlizky, G., Katz, A., van der Laak, J., Boyko, V., Lapidot, M., Beachy, R.N., Heinlein, M., Epel, B.L., 2001. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus interferes with targeting of wild-type movement protein to microtubules. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 895-904.
- Kozłowski, L.P., Bujnicki, J.M., 2012. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics* 13, 111.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A., Waigmann, E., 2003. MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol* 132, 1870-1883.
- Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Lucas, W.J., 1998. Cell-to-cell transport of proteins: Requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* 15, 367-381.
- Krenz, B., Jeske, H., Kleinow, T., 2012. The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Front Plant Sci* 3, 291.
- Krenz, B., Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H., Kleinow, T., 2010. A plastid-targeted heat shock cognate 70kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology* 401, 6-17.
- Kubota, S., Copeland, T.D., Pomerantz, R.J., 1999. Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S25: common features shared with HIV-1 regulatory proteins. *Oncogene* 18, 1503-1514.
- Kuchibhatla, D.B., Sherman, W.A., Chung, B.Y., Cook, S., Schneider, G., Eisenhaber, B., Karlin, D.G., 2014. Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently "orphan" viral proteins. *J. Virol.* 88, 10-20.
- Kumar, M., Gromiha, M.M., Raghava, G.P., 2008. Prediction of RNA binding sites in a protein using SVM and PSSM profile. *Proteins* 71, 189-194.

- Kussel-Andermann, P., El-Amraoui, A., Safieddine, S., Hardelin, J.P., Nouaille, S., Camonis, J., Petit, C., 2000. Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein. *J Biol Chem* 275, 29654-29659.
- Kuwata, S., Kubo, S., Yamashita, S., Doi, Y., 1983. Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 49, 246-251.
- Kyselakova, H., Prokopova, J., Naus, J., Novak, O., Navratil, M., Safarova, D., Spundova, M., Ilik, P., 2011. Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiol Biochem* 49, 1279-1289.
- la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.
- Ladd, A.N., Cooper, T.A., 2004. Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events. *J Cell Sci* 117, 3519-3529.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamond, A.I., Earnshaw, W.C., 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.M., Robinson, D.G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C., Ritzenthaler, C., 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15, 2058-2075.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lauber, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., Jurgens, G., 1997. The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol* 139, 1485-1493.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J.U., Ratsch, G., Weigel, D., 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8795-8800.
- Lazarowitz, S.G., Beachy, R.N., 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11, 535-548.
- Lazarowitz, S.G., McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., 2004. Nuclear shuttling in plant cells. *Symp Soc Exp Biol*, 157-176.
- Lee, C.H., Chang, S.C., Chen, C.J., Chang, M.F., 1998. The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting. *J Biol Chem* 273, 7650-7656.
- Lee, H.J., Kim, J.S., Yoo, S.J., Kang, E.Y., Han, S.H., Yang, K.Y., Kim, Y.C., McSpadden Gardener, B., Kang, H., 2012. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea*, and tobacco mosaic viruses. *Plant Physiol Biochem* 60, 46-52.
- Lee, J.Y., Taoka, K., Yoo, B.C., Ben-Nissan, G., Kim, D.J., Lucas, W.J., 2005. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* 17, 2817-2831.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C., Rojas, M.R., Gomez-Ospina, N., Staehelin, L.A., Lucas, W.J., 2003. Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* 299, 392-396.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
- Leisner, S.M., 1999. Molecular Basis of Virus Transport in Plants, in: Mandahar, C.L. (Ed.), *Molecular Biology of Plant Viruses*. Springer US, Boston: Kluwer, pp. 161-182.
- Lekkerkerker, A., Wellink, J., Yuan, P., van Lent, J., Goldbach, R., van Kammen, A.B., 1996. Distinct functional domains in the cowpea mosaic virus movement protein. *J Virol* 70, 5658-5661.
- Levy, A., Erlanger, M., Rosenthal, M., Epel, B.L., 2007. A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in *Arabidopsis*. *Plant J* 49, 669-682.

- Levy, A., Zheng, J.Y., Lazarowitz, S.G., 2015. Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement. *Curr Biol* 25, 2018-2025.
- Lew, R.R., 1994. Regulation of electrical coupling between *Arabidopsis* root hairs. *Planta* 193, 67–73.
- Lewandowski, D.J., Adkins, S., 2005. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342, 26-37.
- Lewis, J.D., Lazarowitz, S.G., 2010. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2491-2496.
- Li, C.F., Henderson, I.R., Song, L., Fedoroff, N., Lagrange, T., Jacobsen, S.E., 2008. Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 4, e27.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S., Jacobsen, S.E., 2006. An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126, 93-106.
- Li, F.M., Li, Q.Z., 2008. Predicting protein subcellular location using Chou's pseudo amino acid composition and improved hybrid approach. *Protein Pept Lett* 15, 612-616.
- Li, Q., Palukaitis, P., 1996. Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* 216, 71-79.
- Li, Q., Ryu, K.H., Palukaitis, P., 2001. Cucumber mosaic virus-plant interactions: identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 378-385.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Adkins, S., 2009. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390, 110-121.
- Li, Y., Bao, Y.M., Wei, C.H., Kang, Z.S., Zhong, Y.W., Mao, P., Wu, G., Chen, Z.L., Schiemann, J., Nelson, R.S., 2004. Rice dwarf phyto-reovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function. *J Virol* 78, 5382-5389.
- Li, Y., Yamakita, Y., Krug, R.M., 1998. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4864-4869.
- Lim, H.S., Vaira, A.M., Bae, H., Bragg, J.N., Ruzin, S.E., Bauchan, G.R., Dienelt, M.M., Owens, R.A., Hammond, J., 2010. Mutation of a chloroplast-targeting signal in *Alternanthera* mosaic virus TGB3 impairs cell-to-cell movement and eliminates long-distance virus movement. *J Gen Virol* 91, 2102-2115.
- Lin, H., Ding, H., Guo, F.B., Zhang, A.Y., Huang, J., 2008. Predicting subcellular localization of mycobacterial proteins by using Chou's pseudo amino acid composition. *Protein Pept Lett* 15, 739-744.
- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., Lucas, W.J., 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* 8, 343-356.
- Lindbo, J.A., 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol* 145, 1232-1240.
- Lionetti, V., Raiola, A., Cervone, F., Bellincampi, D., 2014. How do pectin methylesterases and their inhibitors affect the spreading of tobamovirus? *Plant Signal Behav* 9, e972863.
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., Nelson, R.S., 2005. The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* 138, 1853-1865.
- Liu, Y., Jia, D., Chen, H., Chen, Q., Xie, L., Wu, Z., Wei, T., 2011. The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. *Arch Virol* 156, 1729-1736.
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C., Clarke, J., 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* 7, 1052-1058.

- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., Chartrand, P., 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* 19, 6592-6601.
- Lot, H., Campbell, R.N., Souche, S., Milne, R.G., Roggero, P., 2002. Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus, and Their Roles in Lettuce Big-Vein Etiology. *Phytopathology* 92, 288-293.
- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J., Forster, R.L., 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 962-974.
- Love, A.J., Laval, V., Geri, C., Laird, J., Tomos, A.D., Hooks, M.A., Milner, J.J., 2007. Components of Arabidopsis defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to Cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 659-670.
- Love, A.J., Yun, B.W., Laval, V., Loake, G.J., Milner, J.J., 2005. Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol* 139, 935-948.
- Lu, L., Wu, G., Xu, X., Luan, H., Zhi, H., Cui, J., Cui, X., Chen, X., 2015. Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with Soybean mosaic virus-encoded P3 protein. *Virus Genes* 50, 333-339.
- Luby-Phelps, K., 2000. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 192, 189-221.
- Lucas, W.J., 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-184.
- Lucas, W.J., Ding, B., van der Schoot, C., 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 125, 435-476.
- Lucas, W.J., Ham, B.K., Kim, J.Y., 2009. Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19, 495-503.
- Lukhovitskaya, N.I., Cowan, G.H., Vetukuri, R.R., Tilsner, J., Torrance, L., Savenkov, E.I., 2015. Importin- α -mediated nucleolar localization of potato mop-top virus TRIPLE GENE BLOCK1 (TGB1) protein facilitates virus systemic movement, whereas TGB1 self-interaction is required for cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 167, 738-752.
- Luo, H., 2016. Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* 17, 1-10.
- Luthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D., 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83-85.
- Lyon, C.E., Bohmann, K., Sleeman, J., Lamond, A.I., 1997. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Exp Cell Res* 230, 84-93.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C., 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Macara, I.G., 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-594, table of contents.
- Macfarlane, S.A., 2010. Tobraviruses--plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol Plant Pathol* 11, 577-583.
- Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S.A., Carrington, J.C., 1998. Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14, 177-186.
- Makarov, V.V., Makarova, S.S., Kalinina, N.O., 2016. Data on structural transitions in domains of hordevirus TGB1 protein forming ribonucleoprotein complex. *Data Brief* 8, 258-261.
- Makarov, V.V., Makarova, S.S., Makhotenko, A.V., Obratsova, E.A., Kalinina, N.O., 2015. In vitro properties of hordevirus TGB1 protein forming ribonucleoprotein complexes. *J Gen Virol* 96, 3422-3431.
- Mallory, A., Vaucheret, H., 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22, 3879-3889.

- Mandahar, C.L., Garg, I.D., 1972. Effect of cucumber mosaic virus on chlorophyll content, photosynthesis, respiration and carbohydrates of infected *Luffa aegyptiaca* Mill. J. Phytopathol 75, 181–186.
- Mann, K.S., Bejerman, N., Johnson, K.N., Dietzgen, R.G., 2016. Cytorhabdovirus P3 genes encode 30K-like cell-to-cell movement proteins. Virology 489, 20–33.
- Margaria, P., Anderson, C.T., Turina, M., Rosa, C., 2016. Identification of Ourmiavirus 30K movement protein amino acid residues involved in symptomatology, viral movement, subcellular localization and tubule formation. Mol Plant Pathol 17, 1063–1079.
- Martín, S., Alioto, D., Milne, R.G., Guerri, J., Moreno, P., 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field trees by direct tissue immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. Plant Pathology 51, 134–141.
- Matsushita, Y., Deguchi, M., Youda, M., Nishiguchi, M., Nyunoya, H., 2001. The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KERP. Mol Cells 12, 57–66.
- Matsushita, Y., Ohshima, M., Yoshioka, K., Nishiguchi, M., Nyunoya, H., 2003. The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of Tomato mosaic virus. J Gen Virol 84, 497–505.
- Maule, A., Faulkner, C., Benitez-Alfonso, Y., 2012. Plasmodesmata "in Comunicado". Front Plant Sci 3, 30.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci 62, 670–684.
- Mayrose, I., Graur, D., Ben-Tal, N., Pupko, T., 2004. Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. Mol Biol Evol 21, 1781–1791.
- McGeachy, K.D., Barker, H., 2000. Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. Mol Plant Microbe Interact 13, 125–128.
- McLean, B.G., Hempel, F.D., Zambryski, P.C., 1997. Plant intercellular communication via plasmodesmata. Plant Cell 9, 1043–1054.
- McLean, B.G., Zambryski, P., 2000. Interactions between viral movement proteins and the cytoskeleton, in: Staiger, C.J., al., e. (Eds.), Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions Kluwer Academic Publishers, pp. 517–540.
- McLean, B.G., Zupan, J., Zambryski, P.C., 1995. Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. Plant Cell 7, 2101–2114.
- Meekes, E.T.M., Verbeek, M., 2011. New insights in Freesia leaf necrosis disease, International Society for Horticultural Science Leuven, Belgium, pp. 231–236.
- Mehta, A., Brasileiro, A.C., Souza, D.S., Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sa, M.F., Silva, M.S., Franco, O.L., Frago, R.R., Bevilacqua, R., Rocha, T.L., 2008. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? FEBS J 275, 3731–3746.
- Mekuria, T., Bamunusinghe, D., Payton, M., Verchot-Lubicz, J., 2008. Phloem unloading of potato virus X movement proteins is regulated by virus and host factors. Mol Plant Microbe Interact 21, 1106–1117.
- Melcher, U., 1990. Similarities between putative transport proteins of plant viruses. J Gen Virol 71 (Pt 5), 1009–1018.
- Melcher, U., 2000. The '30K' superfamily of viral movement proteins. J. Gen. Virol. 81, 257–266.
- Meyer, B.E., Malim, M.H., 1994. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. Genes Dev 8, 1538–1547.
- Meyer, B.E., Meinkoth, J.L., Malim, M.H., 1996. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. J Virol 70, 2350–2359.
- Milne, R.G., Garcia, M.L., Moreno, P., 2003. *Citrus psorosis virus*, AAB descriptions of plant viruses.
- Modena, N.A., Zelada, A.M., Conte, F., Mentaberry, A., 2008. Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a Nicotiana tabacum CK2-like activity. Virus Res 137, 16–23.

- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C., Burgyan, J., 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol* 79, 7812-7818.
- Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C., Baulcombe, D.C., 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126-1129.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H., 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629-639.
- Moreno, P., Guerri, J., García, M.L., 2015. The psorosis disease of citrus: a pale light at the end of the tunnel. *Journal of Citrus Pathology* 2 (1) <http://escholarship.org/uc/item/Otn7m65m>.
- Morikawa, T., Nomura, Y., Yamamoto, T., Natsuaki, T., 1995. Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 61, 578-581.
- Morozov, S., Fedorkin, O.N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C., Atabekov, J.G., 1997. Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J Gen Virol* 78 (Pt 8), 2077-2083.
- Morozov, S.Y., Solovyev, A.G., 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol* 84, 1351-1366.
- Mushegian, A.R., Elena, S.F., 2015. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. *Virology* 476, 304-315.
- Mushegian, A.R., Koonin, E.V., 1993. Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch. Virol.* 133, 239-257.
- Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., Okuno, T., 2001. Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *J Virol* 75, 8045-8053.
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., Furusawa, I., 1997. Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *J Virol* 71, 2270-2276.
- Nakai, K., 2000. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Adv Protein Chem* 54, 277-344.
- Nakai, K., Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24, 34-36.
- Nakashima, H., Nishikawa, K., 1994. Discrimination of intracellular and extracellular proteins using amino acid composition and residue-pair frequencies. *J Mol Biol* 238, 54-61.
- Nakielnny, S., Dreyfuss, G., 1997. Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 9, 420-429.
- Napuli, A.J., Falk, B.W., Dolja, V.V., 2000. Interaction between HSP70 homolog and filamentous virions of the Beet yellows virus. *Virology* 274, 232-239.
- Naum-Ongania, G., Gago-Zachert, S., Pena, E., Grau, O., Garcia, M.L., 2003. Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res.* 96, 49-61.
- Navarro, J.A., Botella, F., Marhuenda, A., Sastre, P., Sánchez-Pina, M.A., Pallas, V., 2005. Identification and partial characterisation of Lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus in common weeds found amongst Spanish lettuce crops and their role in lettuce big-vein disease transmission. *Eur J Plant Pathol* 113, 25-34.
- Navarro, J.A., Botella, F., Maruhenda, A., Sastre, P., Sanchez-Pina, M.A., Pallas, V., 2004. Comparative Infection Progress Analysis of Lettuce big-vein virus and Mirafiori lettuce virus in Lettuce Crops by Developed Molecular Diagnosis Techniques. *Phytopathology* 94, 470-477.
- Nebenfuhr, A., 2002. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Curr Opin Plant Biol* 5, 507-512.

- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., Wileman, T., 2007. A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res* 70, 101-182.
- Nguyen, L., Lucas, W.J., Ding, B., Zaitlin, M., 1996. Viral RNA trafficking is inhibited in replicase-mediated resistant transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12643-12647.
- Niehl, A., Amari, K., Gereige, D., Brandner, K., Mely, Y., Heinlein, M., 2012. Control of Tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol* 160, 2093-2108.
- Niehl, A., Heinlein, M., 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75-99.
- Niehl, A., Pena, E.J., Amari, K., Heinlein, M., 2013. Microtubules in viral replication and transport. *Plant J* 75, 290-308.
- Nigg, E.A., 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- Nigg, E.A., Baeuerle, P.A., Luhrmann, R., 1991. Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell* 66, 15-22.
- Nizami, Z.F., Deryusheva, S., Gall, J.G., 2010. Cajal bodies and histone locus bodies in *Drosophila* and *Xenopus*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 313-320.
- Ogg, S.C., Lamond, A.I., 2002. Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* 159, 17-21.
- Oikawa, K., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kagawa, T., Suetsugu, N., Takahashi, F., Kanegae, T., Niwa, Y., Kadota, A., Wada, M., 2003. Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* 15, 2805-2815.
- Oikawa, K., Yamasato, A., Kong, S.G., Kasahara, M., Nakai, M., Takahashi, F., Ogura, Y., Kagawa, T., Wada, M., 2008. Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiol* 148, 829-842.
- Olson, M.O., Hingorani, K., Szebeni, A., 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* 219, 199-266.
- Ooi, H.S., Kwo, C.Y., Wildpaner, M., Sirota, F.L., Eisenhaber, B., Maurer-Stroh, S., Wong, W.C., Schleiffer, A., Eisenhaber, F., Schneider, G., 2009. ANNIE: integrated de novo protein sequence annotation. *Nucleic Acids Res.* 37, W435-440.
- Oparka, K.J., 2004. Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci* 9, 33-41.
- Oparka, K.J., Prior, D.A., Santa Cruz, S., Padgett, H.S., Beachy, R.N., 1997. Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J* 12, 781-789.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., Epel, B., 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97, 743-754.
- Ostwald, T.J., MacLennan, D.H., 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 974-979.
- Otulak, K., Garbaczewska, G., 2011. Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to Potato virus Y. *Micron* 42, 381-391.
- Ouko, M.O., Sambade, A., Brandner, K., Niehl, A., Pena, E., Ahad, A., Heinlein, M., Nick, P., 2010. Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *Plant J* 62, 829-839.
- Overall, R.L., Blackman, L.M., 1996. A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Sci* 1, 308-311.
- Owen, P.C., 1957a. The effect of infection with tobacco etch virus on the rates of respiration and photosynthesis of tobacco leaves. *Ann. Appl. Biol.* 45, 327-331.
- Owen, P.C., 1957b. The effect of infection with tobacco mosaic of the photosynthesis of tobacco leaves. *Ann. Appl. Biol.* 45, 456-461.
- Owen, P.C., 1958. Photosynthesis and respiration rates of leaves of *Nicotiana glutinosa* infected with tobacco mosaic virus and of *N. tabacum* infected with potato virus X. *Ann. Appl. Biol.* 46, 198-204.

- Paape, M., Solovyev, A.G., Erokhina, T.N., Minina, E.A., Schepetilnikov, M.V., Lesemann, D.E., Schiemann, J., Morozov, S.Y., Kellmann, J.W., 2006. At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 874-883.
- Padgett, H.S., Epel, B.L., Kahn, T.W., Heinlein, M., Watanabe, Y., Beachy, R.N., 1996. Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J* 10, 1079-1088.
- Padidam, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M., 1995. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J Gen Virol* 76 (Pt 1), 25-35.
- Padidam, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M., 1996. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224, 390-404.
- Padmanabhan, M.S., Goregaoker, S.P., Golem, S., Shiferaw, H., Culver, J.N., 2005. Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J Virol* 79, 2549-2558.
- Padmanabhan, M.S., Kramer, S.R., Wang, X., Culver, J.N., 2008. Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J Virol* 82, 2477-2485.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., Weigel, D., 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263.
- Palukaitis, P., Garcia-Arenal, F., 2003. Cucumoviruses. *Adv Virus Res* 62, 241-323.
- Pallas, V., Garcia, J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol* 92, 2691-2705.
- Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J., Nagy, P.D., 2005. Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7326-7331.
- Partridge, J.F., DeBeauchamp, J.L., Kosinski, A.M., Ulrich, D.L., Hadler, M.J., Noffsinger, V.J., 2007. Functional separation of the requirements for establishment and maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell* 26, 593-602.
- Pederson, T., 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26, 3871-3876.
- Pei, J., Kim, B.H., Tang, M., Grishin, N.V., 2007. PROMALS web server for accurate multiple protein sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 35, W649-652.
- Peiro, A., Izquierdo-Garcia, A.C., Sanchez-Navarro, J.A., Pallas, V., Mulet, J.M., Aparicio, F., 2014. Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of Alfalfa mosaic virus and interfere with viral movement. *Mol Plant Pathol* 15, 881-891.
- Pena, E.J., Heinlein, M., 2012. RNA transport during TMV cell-to-cell movement. *Front Plant Sci* 3, 193.
- Peña, E.J., 2009. Búsqueda y caracterización de las proteínas del virus de la Psorosis de los cítricos involucradas en el movimiento y defensa viral, Departamento de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Peña, E.J., Robles Luna, G., Zaneck, M.C., Borniego, M.B., Reyes, C.A., Heinlein, M., García, M.L., 2012. Citrus psorosis and Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus Res.* 170, 34-43.
- Perbal, M.C., Thomas, C.L., Maule, A.J., 1993. Cauliflower mosaic virus gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* 195, 281-285.
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V., 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14771-14776.
- Perez-Canamas, M., Hernandez, C., 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem* 290, 3106-3120.
- Pilon, M., Schekman, R., 1999. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682.
- Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Dawson, W.O., Turpen, T.H., 1998. Tobamovirus Transient Expression Vectors: Tools for Plant Biology and High-Level Expression of Foreign Proteins in Plants, in: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Springer Netherlands, pp. 67-93.

- Pooma, W., Gillette, W.K., Jeffrey, J.L., Petty, I.T., 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* 218, 264-268.
- Procter, J.B., Thompson, J., Letunic, I., Creevey, C., Jossinet, F., Barton, G.J., 2010. Visualization of multiple alignments, phylogenies and gene family evolution. *Nat. Methods* 7, S16-25.
- Prokhnovsky, A.I., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2005. Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *J Virol* 79, 14421-14428.
- Pumplin, N., Voinnet, O., 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* 11, 745-760.
- Pupko, T., Bell, R.E., Mayrose, I., Glaser, F., Ben-Tal, N., 2002. Rate4Site: an algorithmic tool for the identification of functional regions in proteins by surface mapping of evolutionary determinants within their homologues. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S71-77.
- Qi, X., Bao, F.S., Xie, Z., 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One* 4, e4971.
- Qu, F., Morris, T.J., 2002. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 15, 193-202.
- Qu, F., Ye, X., Morris, T.J., 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14732-14737.
- Radford, J.E., Vesk, M., Overall, R.L., 1998. Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma* 201, 30-37.
- Radford, J.E., White, R.G., 2001. Effects of tissue-preparation-induced callose synthesis on estimates of plasmodesma size exclusion limits. *Protoplasma* 216, 47-55.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Barón, M., 2000. Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110, 286-292.
- Rajamaki, M.L., Valkonen, J.P., 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 15, 138-149.
- Rajamaki, M.L., Valkonen, J.P., 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21, 2485-2502.
- Rao, A.L., Cooper, B., Deom, C.M., 1998. Defective Movement of Viruses in the Family Bromoviridae Is Differentially Complemented in *Nicotiana benthamiana* Expressing Tobamovirus or Dianthovirus Movement Proteins. *Phytopathology* 88, 666-672.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D.C., 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
- Reichel, C., Beachy, R.N., 1998. Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11169-11174.
- Reichel, C., Beachy, R.N., 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol* 74, 3330-3337.
- Reichert, S., Knight, A.E., Hodge, T.P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., Kendrick-Jones, J., 1999. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J* 19, 555-567.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., Soding, J., 2012. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9, 173-175.
- Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G., Garcia-Arenal, F., 2006. Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 734-746.

- Reyes, C.A., Ocolotobiche, E.E., Marmisol, F.E., Robles Luna, G., Borniego, M.B., Bazzini, A.A., Asurmendi, S., Garcia, M.L., 2016. Citrus psorosis virus 24K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Mol Plant Pathol* 17, 317-329.
- Rinne, P.L., Kaikuranta, P.M., van der Schoot, C., 2001. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J* 26, 249-264.
- Ritzenthaler, C., Hofmann, C., 2007. Tubule-Guided Movement of Plant Viruses, in: Waigmann, E., Heinlein, M. (Eds.), *Viral Transport in Plants*, pp. 63-83.
- Ritzenthaler, C., Pinck, M., Pinck, L., 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 907-915.
- Roberts, A.G., Oparka, K.J., 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ* 26, 103-124.
- Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C., Oparka, K.J., 2001. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* 218, 31-44.
- Robles Luna, G., 2014. Estudio de la función de las proteínas de *Citrus psorosis virus* y *Mirafiori lettuce big-vein virus*, Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Robles Luna, G., Pena, E.J., Borniego, M.B., Heinlein, M., Garcia, M.L., 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441, 152-161.
- Robles Luna, G., Peña, E.J., Borniego, M.B., Heinlein, M., Garcia, M.L., 2017a. Citrus psorosis virus movement protein contains an aspartic protease motif that mediates autocleavage and tubule-like structure formation at plasmodesmata. En prensa.
- Robles Luna, G., Reyes, C.A., Peña, E.J., Ocolotobiche, E.E., Baeza, C., Borniego, M.B., Kormelink, R., Garcia, M.L., 2017b. Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Res.*
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V., Milne, R.G., 2000. An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Arch. Virol.* 145, 2629-2642.
- Roggero, P., Lot, H., Souche, S., Lenzi, R., Milne, R.G., 2003. Occurrence of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 261-267.
- Roistacher, C.N., 1993. Psorosis, in: Moreno, P., da Graca, J.V., Timmer, L.W. (Ed.), 12th Conf. of IOCV, University of California, Riverside, CA, US, pp. 139-154.
- Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., Benfield, D.A., 1999. The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* 64, 1-12.
- Rowland, R.R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D., Benfield, D.A., 2003. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316, 135-145.
- Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J., Furbank, R.T., 2001. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13, 47-60.
- Rubbi, C.P., Milner, J., 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 22, 6068-6077.
- Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sanchez-Navarro, J., Fagoaga, C., Lopez, C., Navarro, L., Moreno, P., Pena, L., Flores, R., 2013. Citrus tristeza virus p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 26, 306-318.

- Rutherford, S., Moore, I., 2002. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* 5, 518-528.
- Ryabov, E.V., Kim, S.H., Taliansky, M., 2004. Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J Gen Virol* 85, 1329-1333.
- Ryabov, E.V., Oparka, K.J., Santa Cruz, S., Robinson, D.J., Taliansky, M.E., 1998. Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology* 242, 303-313.
- Ryabov, E.V., Roberts, I.M., Palukaitis, P., Taliansky, M., 1999a. Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus. *Virology* 260, 98-108.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J., Taliansky, M., 2001. Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology* 288, 391-400.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J., Taliansky, M.E., 1999b. A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1212-1217.
- Ryder, E.J., Robinson, B.J., 1995. Big-vein resistance in lettuce: Identifying, selecting, and testing resistant cultivars and breeding lines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120, 741-746.
- Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J., Nelis, S., 2012. The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytol* 196, 13-28.
- Sagi, G., Katz, A., Guenoune-Gelbart, D., Epel, B.L., 2005. Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the golgi apparatus. *Plant Cell* 17, 1788-1800.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J., Heinlein, M., 2008. Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic* 9, 2073-2088.
- Sanchez-Navarro, J.A., Bol, J.F., 2001. Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 1051-1062.
- Sánchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Pallás, V., 2006. Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346, 66-73.
- Sánchez de la Torre, E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O., García, M.L., 1998. The top component of *Citrus psorosis virus* contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein, *Mol. Plant Pathol.*
- Sánchez de la Torre, M.E., Lopez, C., Grau, O., Garcia, M.L., 2002. RNA 2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *J. Gen. Virol.* 83, 1777-1781.
- Sanfaçon, H., 2005. Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Can. J. Bot* 83, 1529–1549.
- Sasaki, N., Kaido, M., Okuno, T., Mise, K., 2005. Coat protein-independent cell-to-cell movement of bromoviruses expressing brome mosaic virus movement protein with an adaptation-related amino acid change in the central region. *Arch Virol* 150, 1231-1240.
- Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H., Fujiwara, T., 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* 39, 895-897.
- Sasaya, T., Fujii, H., Ishikawa, K., Koganezawa, H., 2008. Further evidence of Mirafiori lettuce big-vein virus but not of Lettuce big-vein associated virus with big-vein disease in lettuce. *Phytopathology* 98, 464-468.
- Sasaya, T., Koganezawa, H., 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of Mirafiori lettuce big-vein virus and tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72, 20–25.

- Satyanarayana, C., Schroder-Kohne, S., Craig, E.A., Schu, P.V., Horst, M., 2000. Cytosolic Hsp70s are involved in the transport of aminopeptidase 1 from the cytoplasm into the vacuole. *FEBS Lett* 470, 232-238.
- Savenkov, E.I., Germundsson, A., Zamyatnin, A.A., Jr., Sandgren, M., Valkonen, J.P., 2003. Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 84, 1001-1005.
- Savenkov, E.I., Valkonen, J.P., 2001. Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* 283, 285-293.
- Scott, M.S., Boisvert, F.M., McDowall, M.D., Lamond, A.I., Barton, G.J., 2010. Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res* 38, 7388-7399.
- Scott, M.S., Troshin, P.V., Barton, G.J., 2011. NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12, 317.
- Schaller, A., Stintzi, A., 2009. Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70, 1532-1538.
- Schmitz, I., Rao, A.L., 1998. Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology* 248, 323-331.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prufer, D., Rohde, W., Rohfritsch, O., 1997. In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* 235, 311-322.
- Schoelz, J.E., Harries, P.A., Nelson, R.S., 2011. Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant* 4, 813-831.
- Scholthof, H.B., 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci* 10, 376-382.
- Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A., Moffett, P., 2011. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 156, 1548-1555.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M., Jackson, A.O., 1995. Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 213, 425-438.
- Scholthof, H.B., Wu, F.C., Kiernan, J.M., Shepherd, R.J., 1993. The putative zinc finger of a caulimovirus is essential for infectivity but does not influence gene expression. *J Gen Virol* 74 (Pt 4), 775-780.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C., 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* 138, 1842-1852.
- Seifert, K.A., 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Resour* 9 Suppl s1, 83-89.
- Seksek, O., Biwersi, J., Verkman, A.S., 1997. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J Cell Biol* 138, 131-142.
- Semashko, M.A., Rakitina, D.V., Gonzalez, I., Canto, T., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., 2012. Movement protein of hordeivirus interacts in vitro and in vivo with coilin, a major structural protein of Cajal bodies. *Dokl Biochem Biophys* 442, 57-60.
- Seo, E.Y., Nam, J., Kim, H.S., Park, Y.H., Hong, S.M., Lakshman, D., Bae, H., Hammond, J., Lim, H.S., 2014. Selective Interaction Between Chloroplast beta-ATPase and TGB1L88 Retards Severe Symptoms Caused by *Alternanthera* mosaic virus Infection. *Plant Pathol J* 30, 58-67.
- Seyfferth, C., Tsuda, K., 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front Plant Sci* 5, 697.
- Shaw, J., Love, A.J., Makarova, S.S., Kalinina, N.O., Harrison, B.D., Taliansky, M.E., 2014. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa. *Nucleus* 5, 85-94.
- Shaw, P.J., 1996. Nuclear organization in plants. *Essays Biochem* 31, 77-89.

- Shaw, P.J., Brown, J.W., 2004. Plant nuclear bodies. *Curr Opin Plant Biol* 7, 614-620.
- Shemyakina, E.A., Solovyev, A.G., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Schiemann, J., Morozov, S.Y., 2011. The Role of Microtubule Association in Plasmodesmal Targeting of Potato mop-top virus Movement Protein TGBp1. *Open Virol. J.* 5, 1-11.
- Shen, H.B., Chou, K.C., 2007. Virus-PLoc: a fusion classifier for predicting the subcellular localization of viral proteins within host and virus-infected cells. *Biopolymers* 85, 233-240.
- Shen, Y., Zhao, X., Yao, M., Li, C., Miriam, K., Zhang, X., Tao, X., 2014. A versatile complementation assay for cell-to-cell and long distance movements by cucumber mosaic virus based agro-infiltration. *Virus Res* 190, 25-33.
- Sheng, Z., Lewis, J.A., Chirico, W.J., 2004. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J Biol Chem* 279, 40153-40160.
- Shepherd, V.A., Goodwin, P.B., 1992a. Seasonal patterns of cell-to-cell communication in *Chara corallina* Klein ex Willd. I: cell-to-cell communication in vegetative lateral branches during winter and spring. *Plant Cell Environ* 15, 137-150.
- Shepherd, V.A., Goodwin, P.B., 1992b. Seasonal patterns of cell-to-cell communication in *Chara corallina* Klein ex Willd. II: cell-to-cell communication during the development of antheridia. *Plant Cell Environ* 15, 151-162.
- Shi, R., Xu, C., 2011. Prediction of rat protein subcellular localization with pseudo amino acid composition based on multiple sequential features. *Protein Pept Lett* 18, 625-633.
- Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T., 2009. Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. *Arch Virol* 154, 959-967.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., Maule, A.J., 2009. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21, 581-594.
- Siomi, H., Shida, H., Nam, S.H., Nosaka, T., Maki, M., Hatanaka, M., 1988. Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing. *Cell* 55, 197-209.
- Sivaguru, M., Fujiwara, T., Samaj, J., Baluska, F., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkmann, D., Matsumoto, H., 2000. Aluminum-induced 1 \rightarrow 3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol* 124, 991-1006.
- Sleeman, J., Lyon, C.E., Platani, M., Kreivi, J.P., Lamond, A.I., 1998. Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp Cell Res* 243, 290-304.
- Sleeman, J.E., Ajuh, P., Lamond, A.I., 2001. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci* 114, 4407-4419.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., Schreier, P.H., 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2373-2378.
- Soitamo, A.J., Jada, B., Lehto, K., 2012. Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biol* 12, 204.
- Sokolova, M., Prufer, D., Tacke, E., Rohde, W., 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* 400, 201-205.
- Song, L., Han, M.H., Lesicka, J., Fedoroff, N., 2007. Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5437-5442.
- Spitsin, S., Steplewski, K., Fleysh, N., Belanger, H., Mikheeva, T., Shivprasad, S., Dawson, W., Koprowski, H., Yusibov, V., 1999. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein in tobacco mosaic virus (TMV)

- deficient in the production of its native coat protein supports long-distance movement of a chimeric TMV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2549-2553.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Stanley, W.M., 1935. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. *Science* 81, 644-645.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., Somerville, S., 2006. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18, 731-746.
- Stonebloom, S., Burch-Smith, T., Kim, I., Meinke, D., Mindrinos, M., Zambryski, P., 2009. Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17229-17234.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., Goldbach, R.W., 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214, 485-493.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C., Yuan, M., 2010. Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* 22, 1373-1387.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N., Takanami, Y., 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183, 106-113.
- Swaminathan, R., Hoang, C.P., Verkman, A.S., 1997. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys J* 72, 1900-1907.
- Swanson, M., Barker, H., MacFarlane, S.A., 2002. Rapid vascular movement of tobnaviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wildtype viruses. *Ann. Appl. Biol.* 141, 259-266.
- Szabo, E.Z., Manczinger, M., Goblos, A., Kemeny, L., Lakatos, L., 2012. Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to a viral protein. *J Virol* 86, 8324-8327.
- Szécsi, J., Ding, X.S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., Nelson, R.S., Beachy, R.N., 1999. Development of Tobacco mosaic virus infection sites in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 143-152.
- Szittyá, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme Pilcher, R.L., Moulton, V., Burgyan, J., Dalmay, T., 2010. Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog* 6, e1000838.
- Tacke, E., Prufer, D., Schmitz, J., Rohde, W., 1991. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 2035-2038.
- Tacke, E., Schmitz, J., Prufer, D., Rohde, W., 1993. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197, 274-282.
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T., Okada, Y., 1987. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J* 6, 307-311.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y., 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 49, 493-500.
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., Mise, K., 2004. The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *J Gen Virol* 85, 1751-1761.
- Taliansky, M., Roberts, I.M., Kalinina, N., Ryabov, E.V., Raj, S.K., Robinson, D.J., Oparka, K.J., 2003. An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J Virol* 77, 3031-3040.

- Taliansky, M., Torrance, L., Kalinina, N.O., 2008. Role of plant virus movement proteins. *Methods Mol Biol* 451, 33-54.
- Taliansky, M.E., Brown, J.W., Rajamaki, M.L., Valkonen, J.P., Kalinina, N.O., 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* 77, 119-158.
- Taliansky, M.E., Robinson, D.J., 2003. Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. *J Gen Virol* 84, 1951-1960.
- Taly, J.F., Magis, C., Bussotti, G., Chang, J.M., Di Tommaso, P., Erb, I., Espinosa-Carrasco, J., Kemena, C., Notredame, C., 2011. Using the T-Coffee package to build multiple sequence alignments of protein, RNA, DNA sequences and 3D structures. *Nat. Protoc.* 6, 1669-1682.
- Tamai, A., Kubota, K., Nagano, H., Yoshii, M., Ishikawa, M., Mise, K., Meshi, T., 2003. Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. *Virology* 315, 56-67.
- Tamai, A., Meshi, T., 2001. Tobamoviral movement protein transiently expressed in a single epidermal cell functions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 126-134.
- Taoka, K., Ham, B.K., Xoconostle-Cazares, B., Rojas, M.R., Lucas, W.J., 2007. Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell* 19, 1866-1884.
- Tekotte, H., Davis, I., 2002. Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* 18, 636-642.
- Thekke-Veetil, T., Ho, T., Keller, K.E., Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., 2014. A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease. *Virus Res.* 189, 92-96.
- Thiel, H., Hleibieh, K., Gilmer, D., Varrelmann, M., 2012. The P25 pathogenicity factor of Beet necrotic yellow vein virus targets the sugar beet 26S proteasome involved in the induction of a hypersensitive resistance response via interaction with an F-box protein. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 1058-1072.
- Thiel, H., Varrelmann, M., 2009. Identification of Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor-interacting sugar beet proteins that represent putative virus targets or components of plant resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 999-1010.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., Maule, A.J., 2008. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol* 6, e7.
- Thompson, J.R., Garcia-Arenal, F., 1998. The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11 109-114.
- Tilsner, J., Taliansky, M.E., Torrance, L., 2014. *Plant Virus Movement*, eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W., Ladurner, A.G., 2007. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 14, 897-903.
- Tomenius, K., Clapham, D., Meshi, T., 1987. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160, 363-371.
- Torok, V.A., Vetten, H.J., 2002. Characterisation of an ophiovirus associated with *Lettuce ring necrosis*, Joint Conference International Working Groups on Legume and Vegetable Viruses, Bonn, Germany, p. 4.
- Torrance, L., Lukhovitskaya, N.I., Schepetilnikov, M.V., Cowan, G.H., Ziegler, A., Savenkov, E.I., 2009. Unusual long-distance movement strategies of Potato mop-top virus RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 381-390.
- Torrance, L., Wright, K.M., Crutzen, F., Cowan, G.H., Lukhovitskaya, N.I., Bragard, C., Savenkov, E.I., 2011. Unusual features of pomoviral RNA movement. *Front Microbiol* 2, 259.

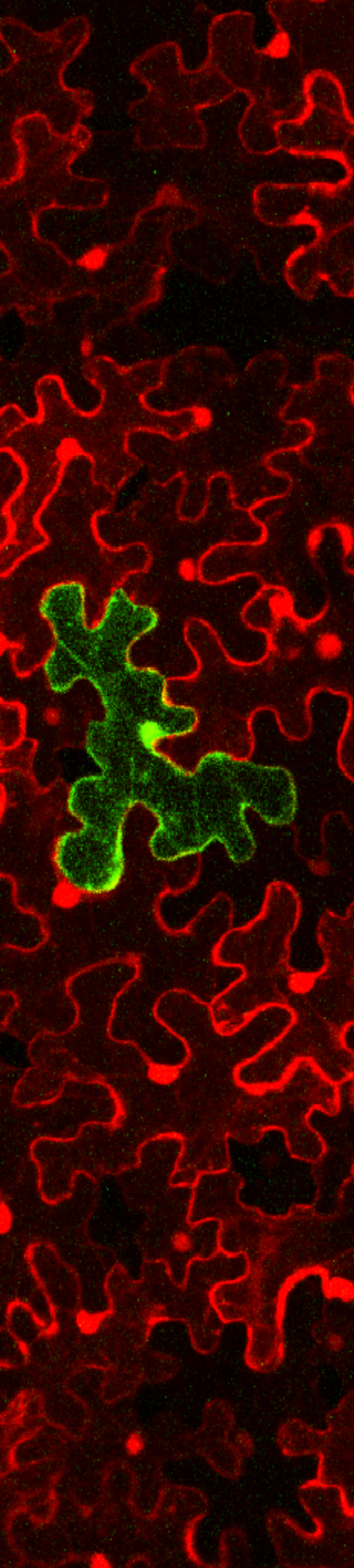
- Torruella, M., Gordon, K., Hohn, T., 1989. Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J* 8, 2819-2825.
- Trutnyeva, K., Bachmaier, R., Waigmann, E., 2005. Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* 332, 563-577.
- Tsai, R.Y., McKay, R.D., 2005. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168, 179-184.
- Tsukahara, F., Maru, Y., 2004. Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem* 279, 8867-8872.
- Tucker, E.B., 1990. Calcium-loaded 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid blocks cell-to-cell diffusion of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta* 182, 34-38.
- Tucker, E.B., 1993. Azide treatment enhances cell-to-cell diffusion in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Protoplasma* 174, 45-49.
- Tucker, E.B., Boss, W.F., 1996. Mastoparan-Induced Intracellular Ca²⁺ Fluxes May Regulate Cell-to-Cell Communication in Plants. *Plant Physiol* 111, 459-467.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T., Citovsky, V., 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu Rev Microbiol* 54, 187-219.
- Ueki, S., Citovsky, V., 2007. Spread throughout the plant: systemic transport of viruses, in: Waigmann, E.a.H., M. (Ed.), *Viral Transport in Plants*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 85-118.
- Ueki, S., Lacroix, B., Citovsky, V., 2011. Protein membrane overlay assay: a protocol to test interaction between soluble and insoluble proteins in vitro. *J Vis Exp*.
- Ueki, S., Spektor, R., Natale, D.M., Citovsky, V., 2010. ANK, a host cytoplasmic receptor for the Tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein, facilitates intercellular transport through plasmodesmata. *PLoS Pathog* 6, e1001201.
- Vaira, A.M., Accotto, G.P., Costantini, A., Milne, R.G., 2003. The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus *Ranunculus white mottle virus* indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. *Arch Virol* 148, 1037-1050.
- Vaira, A.M., García, M.L., Vetten, H.J., Navarro, J.A., Guerri, J., Hammond, J., Verbeek, M., Moreno, P., Natsuaki, T., Gago-Zachert, S., Morikawa, T., Torok, V., Pallás, V., 2011. Ophioviridae in: King, A.M.Q., Adams, M. J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Ed.), *Virus Taxonomy*. IX Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Oxford (UK), pp. 743-748.
- Vaira, A.M., Hansen, M.A., Murphy, C., Reinsel, M.D., Hammond, J., 2009. First report of *Freesia sneak virus* in *Freesia* sp. in Virginia, USA. *Plant Disease* 93, 965.
- Vaira, A.M., Kleynhans, R., Hammond, J., 2007. First report of *Freesia sneak virus* infecting *Lachenalia* cultivars in South Africa. *Plant Disease Report* 91, 770.
- Vaira, A.M., Lisa, V., Costantini, A., Masenga, V., Rapetti, S., Milne, R.G., 2006. Ophioviruses infecting ornamentals and a probable new species associated with a severe disease in freesia. *Acta Hort.* 722, 191-199.
- Vaira, A.M., Milne, R.G., Accotto, G.P., Luisoni, E., Masenga, V., Lisa, V., 1997. Partial characterization of a new virus from *ranunculus* with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Arch. Virol.* 142, 2131-2146.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., Geelen, D., 2004. In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol* 136, 3956-3967.
- van der Schoot, C., Dietrich, M.A., Storms, M., Verbeke, J.A., Lucas, W.J., 1995. Establishment of a cell-to-cell communication pathway between separate carpels during gynoecium development. *Planta* 195, 450-455.
- van der Schoot, C., Rinne, P., 1999. Networks for shoot design. *Trends Plant Sci* 4, 31-37.
- van der Wel, N.N., 2000. Interaction between the *Alfalfa mosaic virus* movement protein and plasmodesmata. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

- van der Wel, N.N., Goldbach, R.W., van Lent, J.W., 1998. The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology* 244, 322-329.
- van der Wilk, F., Dulleman, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., 2002. Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. *J. Gen. Virol.* 83, 2869-2877.
- van Dun, C.M., van Vloten-Doting, L., Bol, J.F., 1988. Expression of alfalfa mosaic virus cDNA1 and 2 in transgenic tobacco plants. *Virology* 163, 572-578.
- van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J., Goldbach, R., 1991. Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J Gen Virol* 72 (Pt 11), 2615-2623.
- van Lent, J.W.M., Schmitt-Keichinger, C., 2006. Viral movement proteins induce tubule formation in plant and insect cells, in: Baluska, F., Volkmann, D., Barlow, P.W. (Eds.), *Cell-Cell channels*. Springer New York, pp. 160-175.
- Vazquez, F., Gasciolli, V., Crete, P., Vaucheret, H., 2004. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14, 346-351.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M., Bamunusinghe, D., 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* 88, 1643-1655.
- Verchot, J., 2016. Plant Virus Infection and the Ubiquitin Proteasome Machinery: Arms Race along the Endoplasmic Reticulum. *Viruses* 8.
- Verma, D.P., 2001. Cytokinesis and Building of the Cell Plate in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 751-784.
- Vetten, H.J., Lesemann, D.E., Dalchow, J., 1987. Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with lettuce big vein disease. *J. Phytopathol* 120, 53-59.
- Vogler, H., Kwon, M.O., Dang, V., Sambade, A., Fasler, M., Ashby, J., Heinlein, M., 2008. Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. *PLoS Pathog.* 4, e1000038.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949-956.
- Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., Voos, W., 1999. The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* 97, 565-574.
- von Barga, S., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B., Kellmann, J.W., 2001. Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol. Biochem* 39, 1083-1093.
- Waigmann, E., Chen, M.H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S., Citovsky, V., 2000. Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J* 19, 4875-4884.
- Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V., Zambryski, P., 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1433-1437.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., Citovsky, V., 2004a. The ins and outs of non-destructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 195-250.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., Citovsky, V., 2004b. The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 195-250.
- Waigmann, E., Zambryski, P., 1995. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 7, 2069-2079.
- Walsh, J.A., 1994. Effects of some biotic and abiotic factors on symptom expression of lettuce big-vein virus in lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Hortic. Sci.* 69, 21-28.
- Wan, J., Cabanillas, D.G., Zheng, H., Laliberte, J.F., 2015. Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol* 167, 1374-1388.

- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C., Bisaro, D.M., 2005. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* 79, 7410-7418.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.Y., Sunter, G., Bisaro, D.M., 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15, 3020-3032.
- Wang, L., Brown, S.J., 2006. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* 34, W243-248.
- Wang, W., Geng, X., Dou, Y., Liu, T., Zheng, X., 2011a. Predicting protein subcellular localization by pseudo amino acid composition with a segment-weighted and features-combined approach. *Protein Pept Lett* 18, 480-487.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascolioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W., 2011b. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625-1638.
- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R., 3rd, 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19, 242-247.
- Wasternack, C., 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100, 681-697.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111, 1021-1058.
- Watanabe, Y., Emori, Y., Ooshika, I., Meshi, T., Ohno, T., Okada, Y., 1984. Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: transient expression of the 30K protein and its mRNA. *Virology* 133, 18-24.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., Wang, A., 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6, e1000962.
- White, R.G., Barton, D.A., 2011. The cytoskeleton in plasmodesmata: a role in intercellular transport? *J Exp Bot* 62, 5249-5266.
- Whitham, S.A., Anderberg, R.J., Chisholm, S.T., Carrington, J.C., 2000. *Arabidopsis* RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12, 569-582.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., Hou, Y.M., 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 33, 271-283.
- Whitham, S.A., Wang, Y., 2004. Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* 7, 365-371.
- Wieczorek, P., Obrepalska-Stepłowska, A., 2015. Suppress to Survive-Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol Biol Report* 33, 335-346.
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35, W407-410.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., Lucas, W.J., 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246, 377-379.
- Wright, K.M., Cowan, G.H., Lukhovitskaya, N.I., Tilsner, J., Roberts, A.G., Savenkov, E.I., Torrance, L., 2010. The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 1486-1497.
- Wu, F., Yu, L., Cao, W., Mao, Y., Liu, Z., He, Y., 2007. The N-terminal double-stranded RNA binding domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* 19, 914-925.

- Wu, Q., Wang, X., Ding, S.W., 2010. Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe* 8, 12-15.
- Wu, S., Zhang, Y., 2008. MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information. *Proteins* 72, 547-556.
- Wu, X., Dinneny, J.R., Crawford, K.M., Rhee, Y., Citovsky, V., Zambryski, P.C., Weigel, D., 2003. Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development* 130, 3735-3745.
- Xiang, Y., Kakani, K., Reade, R., Hui, E., Rochon, D., 2006. A 38-amino-acid sequence encompassing the arm domain of the cucumber necrosis virus coat protein functions as a chloroplast transit Peptide in infected plants. *J Virol* 80, 7952-7964.
- Xiao, X., Wu, Z.C., Chou, K.C., 2011. iLoc-Virus: a multi-label learning classifier for identifying the subcellular localization of virus proteins with both single and multiple sites. *J Theor Biol* 284, 42-51.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A., Carrington, J.C., 2005. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* 138, 2145-2154.
- Xin, H.W., Ji, L.H., Scott, S.W., Symons, R.H., Ding, S.W., 1998. Ilarviruses encode a Cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the Bromoviridae. *J Virol* 72, 6956-6959.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y., Zhou, X., 2008. Identification of a movement protein of the tenuivirus rice stripe virus. *J Virol* 82, 12304-12311.
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.C., Cagatay, T., Grishin, N.V., Chook, Y.M., 2015. LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31, 1357-1365.
- Yaholom, A., Lando, R., Katz, A., Epel, B.L., 1998. A calcium-dependent protein kinase is associated with maize mesocotyl plasmodesmata. *J Plant Physiol* 153 354-362.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7-8.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., Huang, H., 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J* 47, 841-850.
- Ye, C., Dickman, M.B., Whitham, S.A., Payton, M., Verchot, J., 2011. The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol* 156, 741-755.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Valkonen, J.P., 2002. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J Virol* 76, 12981-12991.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X., 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Yu, C., Karlin, D.G., Lu, Y., Wright, K., Chen, J., MacFarlane, S., 2013. Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J. Gen. Virol.* 94, 2117-2128.
- Yuan, C., Lazarowitz, S.G., Citovsky, V., 2016. Identification of a Functional Plasmodesmal Localization Signal in a Plant Viral Cell-To-Cell-Movement Protein. *MBio* 7, e02052-02015.
- Zambryski, P., Crawford, K., 2000. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 393-421.
- Zavaliev, R., Sagi, G., Gera, A., Epel, B.L., 2010. The constitutive expression of Arabidopsis plasmodesmal-associated class 1 reversibly glycosylated polypeptide impairs plant development and virus spread. *J Exp Bot* 61, 131-142.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B.L., Citovsky, V., 2011. Biology of callose (beta-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 117-130.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H., 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20, 3255-3268.

- Zhang, Y., Zhang, C., Li, W., 2012. The nucleocapsid protein of an enveloped plant virus, Tomato spotted wilt virus, facilitates long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virus Res.* 163, 246-253.
- Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., Wu, J., 2015. Biogenesis, Function, and Applications of Virus-Derived Small RNAs in Plants. *Front Microbiol* 6, 1237.
- Zhao, J., Liu, Q., Zhang, H., Jia, Q., Hong, Y., Liu, Y., 2013. The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2(2)-mediated extreme resistance. *Plant Physiol* 161, 374-383.
- Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., Liu, Y., 2016. Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Front Microbiol* 7, 1565.
- Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G.J., Wang, X.J., Qi, Y., 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21, 1190-1203.
- Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., Xie, L., 2015. Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Mol Plant Pathol* 16, 921-930.
- Zheng, Z.L., Guo, L., Jia, J., Xie, C.M., Zeng, W.C., Yang, J., 2011. Compressed learning and its applications to subcellular localization. *Protein Pept Lett* 18, 925-934.
- Zielezinski, A., Karlowski, W.M., 2011. Agos--a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics* 27, 1318-1319.



ANEXOS

ANEXO 1

Género	Genoma	Especie	Factores virales requeridos para el transporte sistémico	Forma viral utilizada para el transporte sistémico	Hospedante	Referencias
ALPHAFLEXIVIRIDAE						
<i>Potexvirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>White clover mosaic virus</i> (WCMV)	CP, TGB1	RNP	<i>N. benthamiana</i>	Lough et al.(2001)
		<i>Potato virus X</i> (PVX)	CP	Virión	<i>N. benthamiana</i>	Betti et al. (2011), Cruz et al. (1998)
BROMOVIRIDAE						
<i>Alfavirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	CP	Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>S. oleracea</i>	Herranz et al. (2012), Spitsin et al. (1999), Tenllado y Bol (2000)
<i>Cucumovirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Tomato aspermy virus</i> (TAV)	CP	Virión	<i>C. sativus</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>N. clevelandii</i>	Llamas et al. (2006), Salánki et al. (2011), Taliansky y García-Arenal (1995)
		<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	CP, MP	Virión	<i>C. sativus</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Squash</i> , <i>N. clevelandii</i>	Llamas et al. (2006), Requena et al. (2006), Salánki et al. (2011), Taliansky y García-Arenal (1995), Thompson et al. (2006); Ueki and Citovsky (2007); Waigmann et al. (2004)
			2b		<i>C. sativus</i>	Brigneti et al. (1998), Ding et al. (1995), Guo and Ding (2002)
<i>Bromovirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	CP, MP	RNP, virión	<i>C. hybridum</i> , <i>H. vulgare</i> , <i>N. benthamiana</i>	Flasinski et al. (1997), Gopinath and Kao (2007), Kao et al. (2011), Okinaka et al. (2001), Sacher and Ahlquist (1989), Takeda et al. (2004)
		<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i> (CCMV)	CP		<i>N. benthamiana</i> , <i>H. vulgare</i> , <i>V. unguiculata</i>	Allison et al. (1990), Schneider et al. (1997)
BUNYAVIRIDAE						
<i>Tospovirus</i>	(-) ssRNA multipartito	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	N (CP), Nsm	RNP	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i>	Lewandowski y Adkins (2005), Li et al. (2009), Zhang et al. (2011), Leastro et al. (2017)
CLOSTEROVIRIDAE						
<i>Closterovirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	CP, p20, p21, L-Pro	Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>A. thaliana</i>	Prokhnovsky et al. (2002), Peng et al. (2003), Peremyslov et al. (2004), Chapman et al. (2004)
		<i>Citrustristeza virus</i> (CTV)	p20, p33, p18, p13		<i>Citrus sp.</i>	Tatineni et al. (2008), Folimonova et al. (2008), Tatineni et al. (2011b)
GEMINIVIRIDAE						
<i>Geminiviridae</i> monopartitos y bipartitos			MP			Revisado en Waigmann et al. (2004), Ueki and Citovsky (2007)
<i>Mastrevirus</i>	ssDNA multipartito	<i>Maize streak virus</i> (MSV)	CP	Virión	<i>Zea mays</i>	Boulton et al. (1989), Liu et al. (2001)

<i>Curtovirus</i>	ssDNA monopartito	<i>Beet mild curly top virus</i> (BMCTV)	CP	Virión	<i>N. benthamiana</i>	Soto et al. (2005)
-------------------	----------------------	-------------------------------------------------	----	--------	-----------------------	--------------------

Género	Genoma	Especie	Factores virales requeridos para el transporte sistémico	Forma viral utilizada para el transporte sistémico	Hospedante	Referencias
<i>Begomovirus</i>	ssDNA monopartito o bipartito	<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	ΔCP, ? CP	RNP* Virión	<i>N. benthamiana</i> <i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>D.</i> <i>stramonium</i>	Jeffrey et al. (1996), Pooma et al. (1996)
		<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	ΔCP, ? CP	RNP* Virión	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	Pooma et al. (1996)
		<i>Tomatoyellow leaf curlvirus</i> (TYLCV)	CP	Virión	<i>N. benthamiana</i>	Noris et al. (1998), Wartig et al. (1997)
		<i>Tomato leaf curl virus</i> (ToLCV) – India	ΔCP, ? CP	RNP* Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>S. lycopersicum</i>	Padidam et al. (1995, 1996)

LUTEOVIRIDAE

<i>Polerovirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Turnip yellows virus</i> (TuYV)	CP, RT, RT*, P4	Virión	<i>C. quinoa</i> , <i>N.</i> <i>clevelandii</i>	Brault et al. (2000, 2003), Bruyère et al. (1997), Ziegler-Graff et al. (1996)
		<i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)	CP, RT, RT*, P4	Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> , <i>P.</i> <i>floridana</i> , <i>S.</i> <i>tuberosum</i>	Kaplan et al. (2007), Lee et al. (2002, 2005), Peter et al. (2008)

POTYVIRIDAE

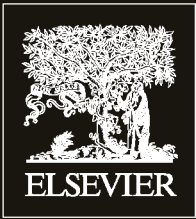
<i>Potyvirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	CP, VPg, HC-Pro		<i>N. tabacum</i>	Dolja et al. (1994), Cronin et al. (1995), López-Moya y Pirone (1998), Schaad et al. (1997), Kasschau y Carrington (2001)
		<i>PotatovirusA</i> (PVA)	CP, VPg, 6K2		<i>N. physaloides</i> , <i>S.</i> <i>commersonii</i>	Hämäläinen et al. (2000), Ivanov et al. (2003), Rajamäki y Valkonen (1999, 2002)

TOMBUSVIRIDAE

<i>Dianthovirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Redclover necrotic mosaic virus</i> (RCNMV)	MP			Revisado en Waigmann et al. (2004), Ueki y Citovsky (2007)
			CP	Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	Vaewhongs y Lommel (1995), Xiong et al. (1993)
			ΔCP, ?	RNP	<i>N. benthamiana</i> (15°C)	
		<i>Carnation ringspot virus</i> (CRSV)	ΔCP, ? CP	RNP* Virión	<i>N. benthamiana</i> <i>N. benthamiana</i>	Park et al. (2012) Sit et al. (2001)
<i>Tombusvirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	ΔCP, ?	RNP*	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	Desvoyes and Scholthof (2002), Qu and Morris (2002), Scholthof et al. (1993)
			CP P19	Virión	<i>S. oleracea</i> , <i>Capsicum</i>	Dunoyer et al. (2010), Scholthof et al. (1995), Voinnet et al. (1999)

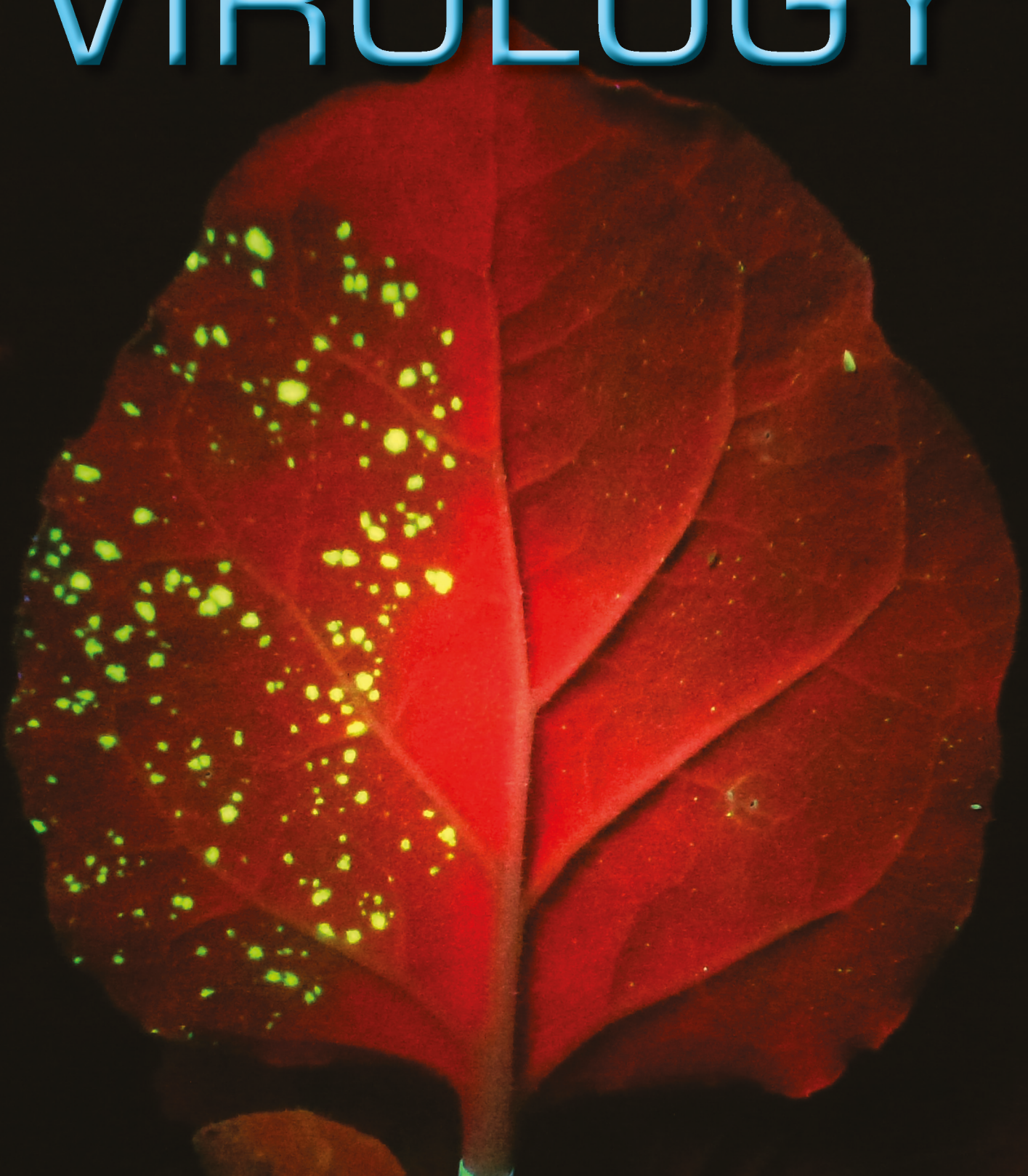
		<i>Cymbidium ringspot virus</i> (CymRSV)	Δ CP, ? CP P19	RNP Virión	<i>N. benthamiana</i> <i>N. clevelandii</i> <i>N. benthamiana</i>	Dalmay et al. (1992) Havelda et al. (2003)
Género	Genoma	Especie	Factores virales requeridos para el transporte sistémico	Forma viral utilizada para el transporte sistémico	Hospedante	Referencias
<i>Carmovirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Turnip crinkle virus</i> (TCV)	CP	Virión	<i>B. campestris</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>A. thaliana</i>	Heaton et al. (1991), Cohen et al. (2000), Qu et al. (2003), Choi et al. (2004), Deleris et al. (2006), Cao et al. (2010)
<i>Necrovirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Olive latent virus</i> (OLV-1)	CP	Virión	<i>N. benthamiana</i>	Pantaleo et al. (1999, 2006)
VIRGA VIRIDAE						
<i>Tobamovirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	CP	Virión	<i>N. sylvestris</i> , <i>N. tabacum</i>	Holt and Beachy (1991), Knorr y Dawson (1988), Osbourn et al. (1990), Saito et al. (1990)
<i>Hordeivirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Barley stripe mosaic virus</i> (BSMV)	TGB1	RNP	<i>H. vulgare</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>C. quinoa</i>	Jackson et al. (2009), Lim et al. (2008), Makarov et al. (2009), Petty et al. (1990), Solov'yev et al. (2012), Verchot-Lubicz et al. (2010)
<i>Pomovirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Potato mop-top virus</i> (PMTV)	Δ CP, TGB1	RNP (solo viriones de RNA1 y 2)	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	McGeachy y Barker (2000), Savenkov (2003), Torrance et al. (2009, 2011), Wright et al. (2010)
<i>Tobravirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	Δ CP, ? (aislamientos NM) CP (aislamientos M)	RNP* Virión	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	Macfarlane (2010), Swanson et al. (2002), Torrance et al. (2011), Wright et al. (2010), Ziegler-Graff et al. (1991)
FAMILIA SIN ASIGNAR						
<i>Umbravirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Groundnut rosette virus</i> (GRV)	P3	RNP	<i>N. benthamiana</i> , <i>C. quinoa</i>	Canetta et al. (2008), Kim et al. (2007a,b), Ryabov et al. (2001), Taliansky et al. (2003)
		<i>Pea enation mosaic virus-2</i> (PEMV-2)	P3	RNP	<i>N. benthamiana</i>	Kim et al. (2007a,b), Ryabov et al. (2001)
<i>Sobemovirus</i>	(+)ssRNA monopartito	<i>Southern bean mosaic virus</i> (SBMV)	CP	Virión	Poroto, V. <i>unguiculata</i>	Fuentes y Hamilton (1993)
<i>Benyvirus</i>	(+)ssRNA multipartito	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	CP, P14	Virión	<i>C. quinoa</i> , <i>T. expansa</i>	Chiba et al. (2013), Lauber et al. (1998), Peltier et al. (2012), Quillet et al. (1989), Ratti et al. (2009)

Proteínas virales involucradas en el movimiento sistémico de los virus mencionados. CP: proteína de cubierta, N: proteína de la nucleocápside, MP: proteína de movimiento, TGB: *triple gene block protein*, VPg: *viral protein genome-linked*; RT: *readthrough protein*; RT*: forma truncada de RT. Se indica también el complejo viral transportado a larga distancia [viriones o complejos de ribonucleoproteínas (RNP)]. En los casos en los que no se conoce con certeza la forma viral de transporte por floema, la forma más probable es indicada en cursiva. En algunos casos, además de los viriones, una forma alternativa de transporte se puede observar cuando se muta o elimina la CP (indicado como Δ CP), aunque el movimiento sistémico de estos complejos de RNP (RNP*) es en general menos eficiente que el que involucra a los viriones.



ISSN 0042-6822
Volume 498, November 2016

VIROLOGY





Elsevier Publishing Campus

Training. Advice. Discussion. Networking.

Free online lectures, training and advice covering:

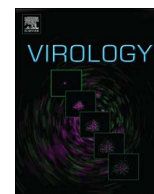
- Introduction to scholarly publishing
- How to get published in a journal
- Book publishing
- Peer review
- Publishing ethics
- Grant writing
- Getting your paper noticed

Helping you on your way to publishing
a world-class book or journal article

publishingcampus.com

ELSEVIER

CAMPUS CERTIFICATES
Get recognition
for courses taken



Bioinformatic and mutational analysis of ophiovirus movement proteins, belonging to the 30K superfamily

María Belén Borniego^{a,1}, David Karlin^{b,c,1}, Eduardo José Peña^a, Gabriel Robles Luna^a,
María Laura García^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT—La Plata CONICET, Fac. Cs. Exactas, U.N.L.P., Calles 49 y 115, La Plata, Argentina

^b Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 3PS, UK

^c The Division of Structural Biology, Henry Wellcome Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2016

Returned to author for revisions

19 August 2016

Accepted 27 August 2016

Keywords:

Movement protein

30K superfamily

Ophiovirus

Negative-strand RNA virus

TMV vector

Citrus psorosis virus

Mirafiori lettuce big-vein virus

ABSTRACT

Ophioviridae is a family of segmented, negative-sense, single-stranded RNA plant viruses. We showed that their cell-to-cell movement protein (MP) is an isolated member of the 30K MP superfamily with a unique structural organization. All 30K MPs share a core domain that contains a nearly-invariant signature aspartate. We examined its role in the MP of *Citrus psorosis virus* (CPsV) and *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV). Alanine substitution of this aspartate prevented plasmodesmata accumulation of MP^{MiLBVV}, while MP^{CPsV} was not affected. The capacity of ophiovirus MPs to increase the plasmodesmata size exclusion limit and non-cell autonomous protein feature was abolished in both mutants. To investigate the role of the signature aspartate in cell-to-cell movement, we constructed a new movement-deficient Tobacco mosaic virus vector used for trans-complementation assays. We showed that both ophiovirus MP mutants lack the cell-to-cell movement capacity, confirming that this signature aspartate is essential for viral cell-to-cell movement.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

For a successful infection, plants viruses must spread from the first infected cells in a process called cell-to-cell movement until they reach the vasculature and rapidly invade the rest of the plant. This crucial process occurs via plasmodesmata (PD), which are intercellular membranous channels that bridge the cytoplasm of contiguous cells (Heinlein and Epel, 2004). PD conductivity is regulated by the plant in order to control the flow of macromolecules (Crawford and Zambryski, 2001; Lucas et al., 2009; Roberts et al., 2001). In particular, PD only let molecules spread by diffusion if their size is below a cut off the molecular size exclusion limit (SEL), specific to each PD (Ding, 1997). Because the SEL of PDs is always much smaller than the size of any known plant virus or viral genome, plant viruses need an active strategy to cross the PD and move from cell to cell. Most plant viral genomes encode a movement protein (MP) gene(s) that is specifically required for virus spread through PD (Heinlein, 2015; Leisner, 1999; Lucas, 2006).

Many movement proteins display 4 properties that may enable

them to mediate viral genome cell-to-cell movement which may be shared by all or most movement proteins. They consist in (1) binding to single-stranded RNA and DNA cooperatively but non-specifically (Karpova et al., 2006; Lough et al., 2000; She-myakina et al., 2011); (2) localizing to and accumulating at PD (Ding et al., 1992; Lucas, 2006; Niehl and Heinlein, 2011); (3) inducing the increase of the PD size exclusion limit; and (4) facilitating their own or heterologous macromolecules intercellular trafficking (Su et al., 2010; Vogler et al., 2008; Waigmann and Zambryski, 1995; Wolf et al., 1989).

Ophioviridae is a family of negative strand RNA plant viruses whose type specie is *Citrus psorosis virus* (CPsV). Ophioviruses cause major diseases in crops of citrus, lettuce, blueberry and ornamental plants (Moreno et al., 2015; Morikawa et al., 1995; Roggero et al., 2000; Thekke-Veetil et al., 2014; Torok and Vetten, 2010; Vaira et al., 2009; Vaira et al., 1997). Their genome is divided into 3 segments for CPsV and 4 segments for *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV) (Vaira et al., 2011). RNA 2 encodes the movement protein, named 54K for CPsV and 55K for MiLBVV (Hiraguri et al., 2013; Robles Luna et al., 2013).

MPs are currently grouped in four different structural classes, of which the largest is the 30K superfamily, composed of members structurally related to the 30 kDa MP of *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Koonin et al., 1991; Melcher, 2000; Mushegian and Koonin, 1993). While this work was in preparation, Mushegian and Elena (2015)

* Corresponding author.

E-mail address: garcia_m@biol.unlp.edu.ar (M.L. García).

¹ Equal contributor.

reported that the ophiovirus MP was a member of the 30K superfamily on the basis of sequence analyses. However, in this work we have made a more extensive analysis of the MP, we have delineated the 30K core domain, and we provide biological evidence. MPs of the 30K superfamily have poor overall sequence conservation, but share a conserved core domain with the same predicted secondary structure which consists of 1 α -helix and 7 predicted β -strands (Melcher, 2000; Mushegian and Elena, 2015; Yu et al., 2013). The only sequence feature common to all 30K MPs is a short region between β -strands 1 and 2, which contains several conserved hydrophobic positions, and a nearly-invariant aspartate which constitutes the sequence signature of the superfamily (Melcher, 2000; Mushegian and Koonin, 1993; Yu et al., 2013). This aspartate appears to be required for the movement activity of these MPs (Bertens et al., 2000; Li et al., 2009; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2012), but its precise molecular function is unknown.

In a previous study, we demonstrated that the MPs of CPsV and MiLBVV localize to PD, enhance GFP cell-to-cell diffusion, spread to neighboring epidermal cells and can trans-complement cell-to-cell movement of mutants of *Potato virus X* (PVX) and TMV that are defective for movement (Robles Luna et al., 2013). We now asked the following questions: what is the predicted structural organization of the ophiovirus MP? Can it be assigned to a group within the 30K superfamily or it is an isolated member? What is the role of the signature aspartate in ophiovirus MP? We answered these questions by a combination of bioinformatics and biological analyses.

2. Results and discussion

2.1. The ophiovirus MP is an isolated member of the 30K superfamily, and has a unique N-terminal domain

Fig. 1 presents an alignment of the sequences of ophiovirus MPs, with their predicted secondary structure. HHpred (see Methods) on aligned ophiovirus MPs identified a match to PFAM family 3A, which corresponds to the 30K MPs of a wide group of taxa including, among others, *Bromoviridae*, *Virgaviridae* and *Tospoviruses*. This match had a marginal E-value ($E=1$). We examined it using the software HAlign (Biegert et al., 2006), which is more sensitive, and is used to validate homologs. HAlign returned a statistically significant E-value ($E=7.10^{-4}$) for the comparison between the MPs of ophioviruses and the MPs of the PFAM family 3A, indicating that ophiovirus MPs are homologous to these MPs, and thus are part of the 30K superfamily. While this work was in preparation, Mushegian and Elena (2015) reported similar findings. Examination of the predicted secondary structure of the ophiovirus MP indicates that its core domain (helix α A and strands β 1 to β 7' in the nomenclature of Melcher (2000)) is located between amino acids (aa) 90 and 233 in CPsV numbering (Fig. 1, see below). The signature D* residue is boxed in Fig. 1.

In summary, the predicted structural organization of ophiovirus MPs is presented in Fig. 1. They are predicted to be organized in 6 regions (Fig. 1): (1) a disordered N-terminus, variable in sequence and in length (not shown in the alignment); (2) an N-terminal domain conserved in sequence in ophioviruses (strands β X to β Z); (3) the core domain common to all 30K MPs (helix α A and strands β 1 to β 7'), containing the signature D* residue (boxed in Fig. 1); (4) a long, disordered, central region; (5) a C-terminal domain, conserved in secondary structure but not in sequence; (6) a short, variable disordered C-terminus (not shown in the alignment). The central, disordered region contains two parts: (i) a long segment with the potential to form an α -helix (α B), rich in charged residues, and (ii) a region highly variable in sequence downstream of α B. The first 35 amino acids of the C-terminal domain probably form a highly flexible loop, in view of

their sequence variability and low predicted secondary structure content (Fig. 1). Interestingly, we noticed that the C-terminal domain contains a strictly conserved DTG tripeptide (boxed in Fig. 1). It is probably conserved for functional, rather than structural reasons. This conserved tripeptide has not been described in the C-terminus of other 30K MPs, to our knowledge.

We then examined the evolutionary relationship of the ophiovirus MP to other 30K MPs. A Psiblast search on the core domain of ophiovirus MPs found no statistically significant match ($E < 10^{-3}$), although it returned a marginal hit ($E=3.1$) to an MP of the 30K superfamily, the PC4 protein of *Iranian wheat stripe tenuivirus* (accession number AAP82278.1), with 17% sequence identity over 131 aas. By comparison, in a previous study, a Psiblast query on a single 30K MP, that of trichovirus, retrieved most 30K MPs with significant E-values (Mushegian and Elena, 2015). Therefore, the lack of significant matches to ophiovirus MPs in Psiblast clearly indicates that ophiovirus MPs are evolutionarily distant from most other 30K MPs.

At present, the phylogeny of highly distant proteins cannot be reliably inferred, and consequently we could not use the core domain to infer evolutionary relationships between the MP of ophioviruses and that of other 30K MPs. However, one can use derived characters, i.e. characters that are not common to a whole family of proteins, to assess phylogenetic relationships between these proteins. The N-terminal domain of the ophiovirus 30K MP may be such a derived character. Accordingly, we performed homology searches on this N-terminal domain to determine whether we could identify matches to other 30K MPs. We could identify no homologs of this N-terminal domain, even by examining all hits with marginal significance up to an E-value of 10,000 using Psiblast. Therefore, the N-terminal domain is conserved in sequence only in ophioviruses. When combined, the results above clearly indicate that the ophiovirus MP is an isolated member of the 30K superfamily, distantly related to tenuivirus MPs.

2.2. Alanine substitution of the signature aspartate affects differently the PD localization of MPs of CPsV and MiLBVV

To investigate the role of the signature aspartate of the ophiovirus MPs in PD localization, we constructed mutants replacing the aspartate by alanine, generating MP^{CPsV}D141A and MP^{MiLBVV}D174A. We co-expressed the mutants fused to eGFP (MP^{CPsV}D141A:eGFP and MP^{MiLBVV}D174A:eGFP) with the PD marker PDCB1:mCherry in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells by agroinfiltration, and visualized their localization by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Mutant MP^{CPsV}D141A:eGFP co-localizes with the PD marker, as does the wild-type protein MP^{CPsV}:eGFP (Fig. 2A and B). In contrast, the MP^{MiLBVV}D174A:eGFP mutant did not localize at the PD, but remained localized in the cytoplasm (compare Fig. 2C and D), indicating that the alanine substitution of the aspartate abolishes the localization at PD. Thus, in these two ophioviruses, the signature aspartate plays a different role in the ability of the MP to localize at PD. The expression, size and integrity of the fusion proteins were confirmed by western blot (See Supplementary Fig. 1A).

The effect of substituting the signature aspartate of a 30K MP on localization to the PD has been studied in the genera *Tospovirus*, *Comovirus*, *Emaravirus*, *Tobamovirus* and *Cytorhabdovirus*. It has been shown that the signature aspartate D154 of the MP (NSm) of the tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), does not seem to be involved in its subcellular distribution, since when it is replaced by alanine, the cellular distribution of the MP is conserved (Li et al., 2009). In contrast, the substitution D143A in the MP of *Cowpea mosaic virus* reduces its efficiency to target the plasma membrane of the cell (Bertens et al., 2000). Alanine substitution of D127 in the MP of *Raspberry leaf blotch virus* (RLBV) causes loss of

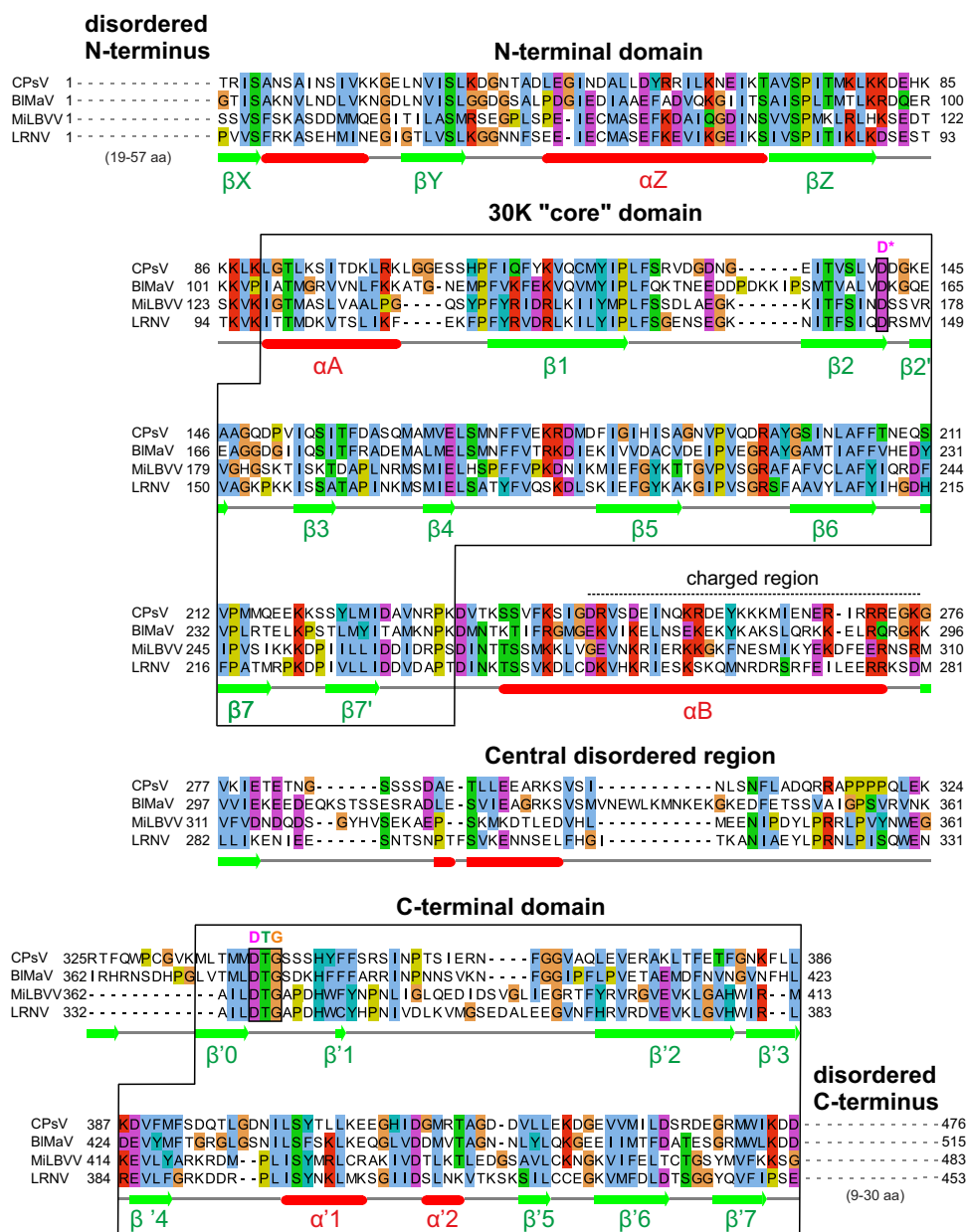


Fig. 1. Sequence alignment and predicted structural organization of ophiiovirus MPs. The MPs sequences are those of *Citrus psorosis virus* (CPsV, accession number AAM47152.1), *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV, accession AGG54707.1), *Blueberry mosaic associated virus* (BImaV, accession AIF28243.1), and *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV, accession YP_053238.1). The boundaries of the central disordered region are approximate. The signature D residue (D*) downstream of $\beta 2$ and the DTG tripeptide are boxed.

PD localization, although the protein remains associated with membranes (Yu et al., 2013). In the tobamovirus *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) the alanine substitution of the signature D103 of its MP (P30) causes the loss of PD localization (Mann et al., 2016). Within the genus *Cytorhabdovirus*, the alanine substitution of the signature D impairs PD targeting of *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV) MP (P3), while the P3 localization of *Alfalfa dwarf virus* (ADV) was mostly unaffected by that substitution (Mann et al., 2016). Thus, this aspartate appears to play no consistent role in subcellular localization, which could explain the contrasting results observed in the two ophiiovirus mutants.

2.3. The signature aspartate of ophiiovirus MPs is required to increase the size exclusion limit (SEL) of the plasmodesmata

It is known that in tobacco sink leaves, but not in source leaves,

GFP (27 kDa) and other molecules of up to 50 kDa can diffuse freely through PD (Oparka et al., 1999). We previously showed that MP^{CPsV} and MP^{MiLBVV} are able to increase the PD SEL in source tissues (mature leaves), allowing GFP cell-to-cell diffusion (Robles Luna et al., 2013). We investigated whether the signature aspartate in the MP of both ophiioviruses was required for this activity, by using gating assays. We co-infiltrate *Agrobacterium tumefaciens* cultures that allow the expression of GFP and the MPs in *N. benthamiana* source leaves. Isolated cells expressing GFP were achieved by using highly diluted cultures of *Agrobacterium*, while to ensure that all cells of the infiltrated area express either MP^{CPsV}D141A:mRFP, MP^{MiLBVV}D174A:mRFP or mRFP (negative control), the corresponding *Agrobacterium* cultures were used at high concentration. Expression of mRFP fusion proteins was tested by western blot (see Supplementary Fig. 1). Fig. 3A and B(i) show that GFP fluorescent clusters of 2–6 cells were observed in 100% of

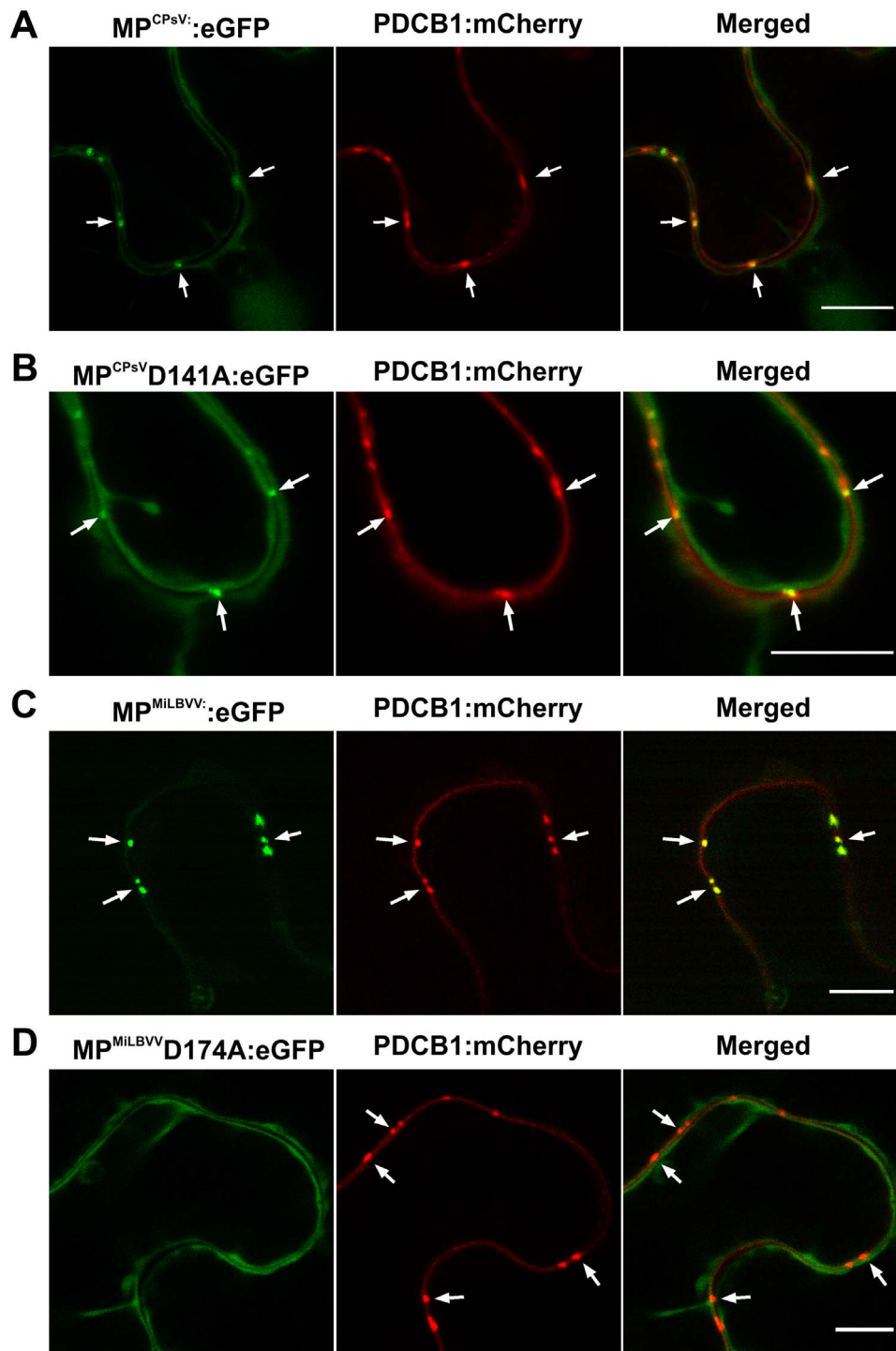


Fig. 2. Subcellular localization of MP^{CPsV}D141A and MP^{MiLBVV}D174A mutants. CLSM at 3 dpai in *N. benthamiana* epidermal cell co-expressing MP^{CPsV}:eGFP (A), MP^{CPsV}D141A:eGFP (B), MP^{MiLBVV}:eGFP (C) or MP^{MiLBVV}D174A:eGFP (D) with PDCB1:mCherry. Scale bar = 10 μ m. Arrows indicate PD.

the analysed foci for MP^{CPsV}:mRFP and 67% for MP^{MiLBVV}:mRFP. In contrast, when mutant MPs were co-expressed, fluorescence remained almost exclusively within the transformed cell (14% of foci with 2–3 cells in the case of MP^{CPsV}D141A: mRFP and 11% for MP^{MiLBVV}D174A: mRFP, similar to the negative control). These results indicate that the mutants were not able to facilitate the intercellular passage of GFP. Another feature of ophiiovirus MP is their ability to mediate their own transport through PD (Robles Luna et al., 2013), the non-cell autonomous protein (NCAP) feature. Thus, our next goal was to analyse whether the mutants MP^{CPsV}D141A and MP^{MiLBVV}D174A are NCAPs. To address this

question, we infiltrated *N. benthamiana* leaves with highly diluted *Agrobacterium* cultures to express either MP^{CPsV}D141A:eGFP or MP^{MiLBVV}D174A:eGFP in isolated epidermal cells. If MP mutants lost the ability to mediate their own transport through PD, GFP fluorescence would remain within the transformed cells. Indeed, GFP fluorescence was observed mainly in isolated cells, with only 16% of foci with 2 or more cells in the case of both MP^{CPsV}D141A:eGFP and MP^{MiLBVV}D174A:eGFP, in contrast to nearly 90% obtained with wild-type MPs (Fig. 3A and B(ii)).

Together, these results indicate that the alanine substitution of the aspartate prevents MPs from modifying the PD SEL, and from

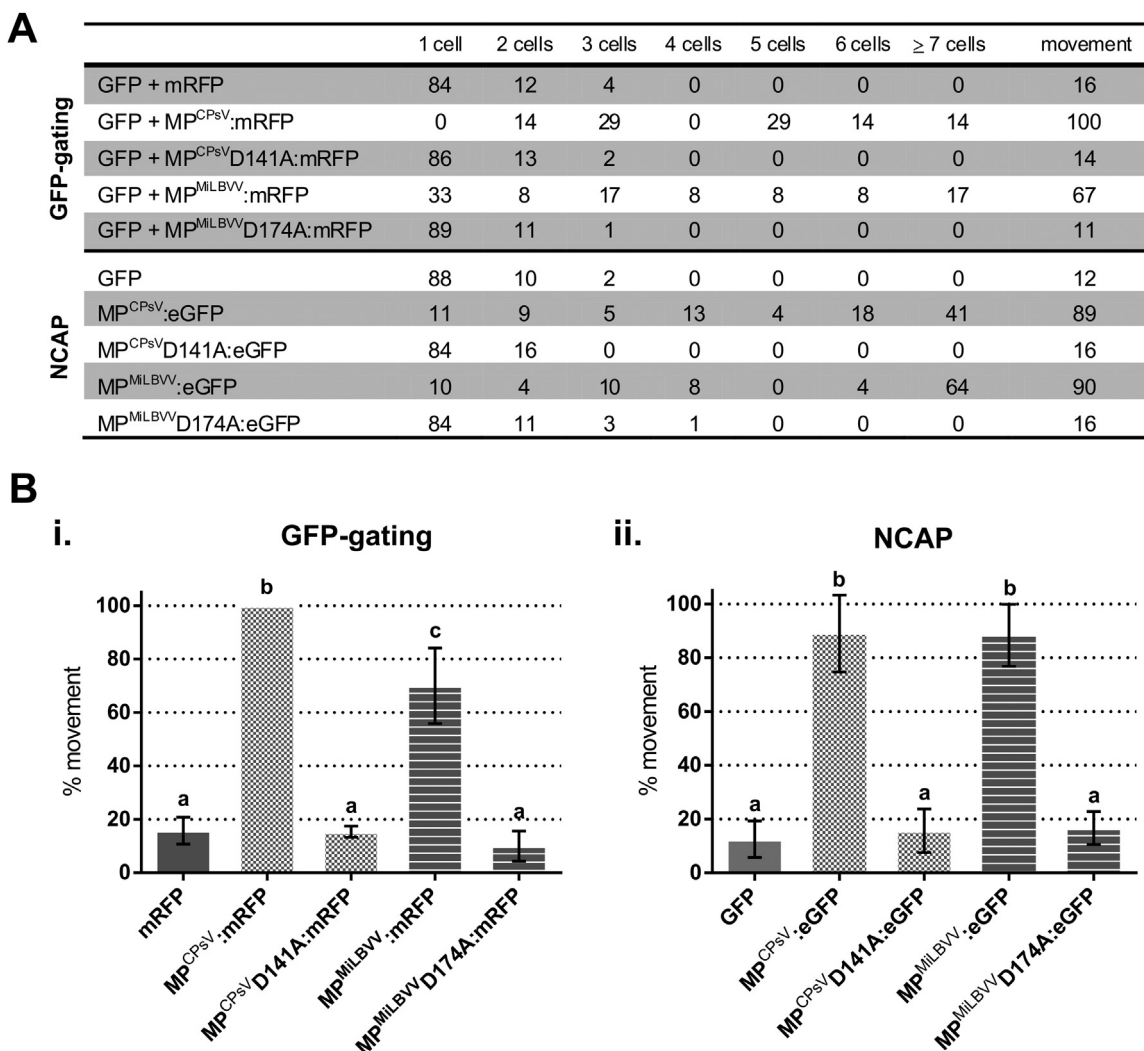


Fig. 3. GFP-gating and NCAP assays of MP^{CPsV}D141A and MP^{MILBVV}D174A mutants in *N. benthamiana* leaves. (A) Table indicating the percentage of GFP-fluorescent foci at 3 days post agro-infiltration (dpai) with the number of cells in each focus for the conditions described in the left column. Movement = % of foci with GFP signal in ≥ 2 adjacent cells. (B) Graphs showing the percentage of GFP-fluorescent foci with more than one cell indicating the ability of the mutants to facilitate the intercellular diffusion of cytosolic GFP (i) or to mediate their own transport through PD (NCAP) (ii). Bars represent mean values ± SD from 4 (GFP-gating) or 3 (NCAP) independent experiments. Means with different letters are significantly different (Tukey's HSD, $p < 0.001$).

facilitating their own movement between adjacent cells.

Heinlein (2015) mentioned that the presence of accumulated MP in PD does not necessarily indicate that the PD are gated. Accumulation of MP in PD and gating may even represent independent functions of MP. In this context, the results obtained with the MP^{CPsV}D141A mutant support this idea, since this mutant accumulates at PD but is not able to gate the PD.

2.4. The signature aspartate of ophiiovirus MPs is essential for viral movement

We could not perform direct assays of the movement function of MPs in the context of viral infection because an ophiiovirus infectious clone system is not available yet. Therefore, we decided to test heterologous viral movement complementation. We created a new TMV-based vector deficient in cell-to-cell movement, which could be used by *Agrobacterium* infiltration rather than in vitro transcription. This vector derived from the pJL-TRBO-G infectious clone (Lindbo, 2007). The vector carries a large N-terminal deletion in its MP, and expresses GFP instead of the coat protein (CP) under the control of the CP subgenomic promoter (TMVΔMPΔCP-GFP) (Fig. 4A(i)). We optimized the conditions for trans-

complementation assays using ectopic expression of the MP of TMV (MP^{TMV}) from a binary vector, as positive control (Fig. 4A(ii) and A(iii)). We performed assays by infiltrating *Agrobacterium* culture to express either of each MP fused to mRFP, or free mRFP (used as negative control), together with a diluted *Agrobacterium* culture carrying the TMVΔMPΔCP-GFP vector into *N. benthamiana* leaves. At 5 days post agroinfiltration (dpai), GFP fluorescence was detected only in isolated cells of leaves expressing TMVΔMPΔCP-GFP together with mRFP, showing that this TMV mutant can replicate in the transformed cell but not move to adjacent cells (Fig. 4B (negative controls) and C(i)). In contrast, when TMVΔMPΔCP-GFP was co-expressed with any of the tested MPs, expanding foci of several cells expressing GFP were detected, indicating that the TMV mutant could move efficiently from the original cell into neighboring cells (Fig. 4A(iii), B (positive controls), C(ii) and C(iv)). These results demonstrate that the ectopic expression of MP^{TMV}:mRFP by binary vector was able to complement the cell-to-cell movement of the TMVΔMPΔCP-GFP reporter, indicating that this new vector is functional for trans-complementation assays. As expected, MP^{CPsV}:mRFP and MP^{MILBVV}:mRFP proteins were also able to restore the movement of the TMV, as we have been previously shown with other two

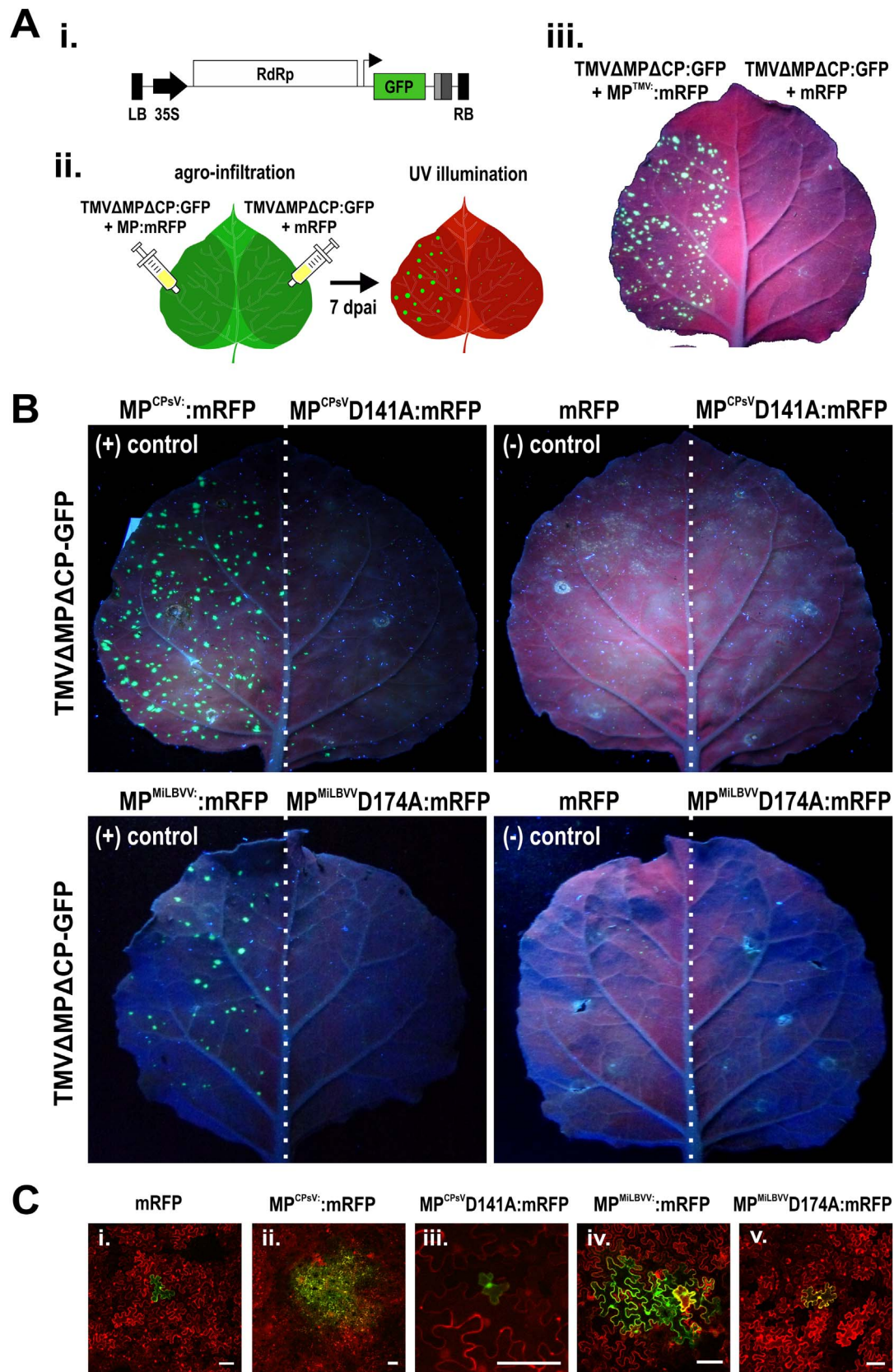


Fig. 4. Movement trans-complementation assay of TMVΔMPΔCP-GFP vector with MP^{CPsV}D141A and MP^{MILBVV}D174A mutants in *N. benthamiana* leaves. (A) (i) Schematic representation of the T-DNA region of the movement-deficient TMV vector TMVΔMPΔCP-GFP. Block arrow, CaMV duplicated 35S promoter; dark gray box, CaMV polyA signal sequence/terminator; light gray box, Ribozyme; bent arrows, subgenomic promoter. RdRp, TMV 126K/183K ORF; GFP, green fluorescent protein ORF; LB, left border; RB, right border. (ii) Illustration of trans-complementation assay using agro-infiltration (iii) Representative images of UV illuminated *N. benthamiana* leaves co-expressing TMVΔMPΔCP-GFP and MP^{TMV}:mRFP on the left side or mRFP on the right side at 7 dpi. (B) Representative images of UV illuminated *N. benthamiana* leaves co-expressing TMVΔMPΔCP-GFP and the proteins indicated above, taken at 7 dpi. (C) Representative images of the size of TMVΔMPΔCP-GFP infection foci observed on leaves agroinfiltrated for the expression of (i) mRFP, (ii) MP^{CPsV}:mRFP, (iii) MP^{CPsV}D141A:mRFP, (iv) MP^{MILBVV}:mRFP or (v) MP^{MILBVV}D174A:mRFP. Fluorescence was monitored with a confocal laser scanning microscope at 5 dpi. Scale bar = 100 μm.

movement-deficient viral vectors (Robles Luna et al., 2013).

To determine the impact of the D mutation in cell-to-cell movement, we conducted the same assay with MP^{CPsV}D141A: mRFP or MP^{MiLBVV}D174A:mRFP mutants. For both mutants, we visualized by GFP fluorescence, foci consisting of single cells (Fig. 4B and C(iii)(v)). Thus, none of these mutants were able to complement the TMVΔMPΔCP-GFP movement mutant, indicating that the signature aspartate is essential for movement complementation. Similar results have been found for the viruses RLBV (*Emaravirus*) (Yu et al., 2013), *Rice stripe virus* (*Tenuivirus*) (Zhang et al., 2012), TSWV (Li et al., 2009), *Tobacco rattle virus* (*Tobravirus*) (Yu et al., 2013), TVCV, ADV and LNYV (Mann et al., 2016), supporting the importance of the signature aspartate for movement function. These results, together with the differences observed in the subcellular localization, show that PD localization may not be correlated with cell-to-cell movement. Thus, although the signature aspartate seems to be roughly involved in cell-to-cell movement of the 30K MPs, it does not appear to exert the same role on PD localization in all 30K MPs, even between viruses belonging to the same genus as happen with cytorhabdo and ophioviruses.

3. Conclusions

To gain insight into the cell-to-cell movement mechanism of ophioviruses, we realized an exhaustive sequence and structure prediction analysis, together with functional studies on the MPs of this family of negative segmented viruses. We found that the ophiovirus MP is an isolated member of the 30K superfamily, with a unique organization. In ophioviruses, the signature aspartate of the MP is necessary to increase the size exclusion limit of the plasmodesmata, to maintain its NCAP capacity and to support cell-to-cell movement of a movement-deficient TMV virus mutant. In contrast, it is not consistently needed for PD localization in CPsV and MiLBVV. By comparing these results with earlier studies in other virus genera, we can conclude that in the superfamily of 30K MPs, the signature aspartate has a conserved role in the movement activities.

4. Materials and methods

4.1. Protein sequence analyses

We used ANNIE (Ooi et al., 2009) to predict protein structural organization. We used Psi-Coffee (Di Tommaso et al., 2011; Taly et al., 2011) for multiple sequence alignments. The alignment is presented using Jalview (Waterhouse et al., 2009) with the ClustalX colouring scheme (see Fig. 2b and d in Procter et al. (2010)). The secondary structure of individual sequences was predicted using Jpred (Cole et al., 2008), and was verified in the context of multiple alignments using PROMALS (Pei et al., 2007). We predicted disordered regions with MetaDisorder (Kozłowski and Bujnicki, 2012), according to the principles described in (Ferron et al., 2006).

For remote homology detection we used the profile-sequence comparison method Psi-Blast (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) and the profile-profile comparison methods HHblits (Remmert et al., 2012) and HHpred (Hildebrand et al., 2009), as described in (Kuchibhatla et al., 2014), against the databases PFAM, version 30 (Finn et al., 2016), with a standard cut-off E-value of 10^{-3} . We used HAlign (Biegert et al., 2006) to validate potential homologs by pairwise comparison, with a cut-off E-value of 10^{-3} .

4.2. Plasmid construction

The wild type MP^{CPsV} and MP^{MiLBVV} fusions constructs and their expression in leaves of *N. benthamiana* were described previously (Robles Luna et al., 2013). MP^{CPsV} and MP^{MiLBVV} mutants were constructed by using overlapping PCR with mutagenic primers and cloned into PCR8/GW/TOPO (ThermoFisher Scientific). The resulting entry plasmids were digested with *Xho*I and recombined with the plant expression vectors pB7RWG2 and pB7FWG2 (Karimi et al., 2002) to obtain C-terminal fusions to mRFP or eGFP, using LR Clonase II Enzyme Mix Kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Correct cloning was confirmed by DNA sequencing. Verified recombinant plasmids were transferred to *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

TMVΔMPΔCP-GFP was constructed from pJL-TRBO-G (kindly provided by Jonh A. Lindbo) (Lindbo, 2007). A fragment of 489 nt corresponding to the positions 57–545 of the MP was deleted by PCR using *Pfu* DNA polymerase (INBIO Highway) and oligonucleotides: 5'-GGTTACCTAAATAATAGACGGAGGGCCCATGGAAC-3' and 5'-TCTATTATTAGGTAACCTTTGTTCAGGTCGATAAACTC-3'. The amplified 11 kb PCR product was transformed into *E. coli* strain DH5α. The construct was verified by DNA sequencing and the plasmid transferred to *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

4.3. Plant agroinfiltration

Agroinfiltration experiments were performed in 5 to 6 week old *N. benthamiana* plants maintained in a growth chamber at 23 °C to 25 °C with 16 h light/8 h dark photoperiod. *A. tumefaciens* cultures were harvested by centrifugation, diluted in water to a cell density OD_{600 nm} value of 0.3 or as indicated, and infiltrated with 1-ml needleless syringe into the abaxial side of the leaf. Leaves were observed at 2–5 days post agroinfiltration (dpai). The expression of the fusion proteins was confirmed by western blot.

4.4. Protein analysis

Total soluble protein extracts of agroinfiltrated plant tissue were prepared by grinding of leaf material frozen in liquid nitrogen and then homogenizing in protein extraction buffer (75 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS and 1.0 mM PMSF) at 4 °C, shaking for 15 min. Extracts were mixed with sample buffer, boiled for 10 min, and clarified by centrifuging for 5 min at 13,000 rpm. Clarified supernatants were separated on 12% [w/v] SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham Hybond-P; GE Healthcare), and blocked with 5% (w/v) nonfat milk powder in Tris-buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween-20. eGFP and mRFP fusion proteins were detected with anti-GFP (JL-8) monoclonal antibody (BD Biosciences Clontech, USA) and anti-mRFP [6G6] monoclonal anti body (Chromotek, Germany), respectively. Horseradish Peroxidase conjugated anti-mouse (BioRad, USA) was used as secondary antibody. Protein sizes were estimated using the PageRuler™ pre-stained protein ladder 10–180 kDa (ThermoFisher Scientific).

4.5. Fluorescence microscopy

CLSM was performed using a Leica TCS SP5 II microscope equipped with a HCX PL APO CS 63.0 × 1.40 OIL UV objective, excitation/emission wavelength of 488/524–550 nm for eGFP and of 543/566–634 nm for mRFP, and LAS AF version 2.2.1 4842 software. Images were processed with ImageJ software.

4.6. PD gating assays

PD gating was approached as described previously (Bayne et al., 2005), with minor modifications. Fully expanded leaves of *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated with diluted *Agrobacterium* cultures carrying pGDG (for cytosolic GFP expression) (Goodin et al., 2002) at $OD_{600\text{ nm}} = 5.0 \times 10^{-4}$ and the construct that expressed the silencing suppressor p19 (pBin61-P19) (Voinnet et al., 2003) at $OD_{600\text{ nm}} = 0.2$ together with *Agrobacterium* cultures carrying the construct that expressed either the negative (mRFP) or positive controls (MP^{CPsV}:mRFP or MP^{MILBVV}:mRFP) at $OD_{600\text{ nm}} = 0.3$ in one half of the leaf allowing GFP expression in isolated epidermal cells, or together with *Agrobacterium* cultures carrying either MP^{CPsV}D141A:mRFP or MP^{MILBVV}D174A:mRFP ($OD_{600\text{ nm}} = 0.3$), on the other side. To evaluate NCAP activity, leaves were co-agroinfiltrated with a diluted *Agrobacterium* culture ($OD_{600\text{ nm}} = 5 \times 10^{-4}$) carrying pGDG, pB7-MP^{CPsV}:eGFP, pB7-MP^{MILBVV}:eGFP, pB7-MP^{CPsV}D141A:eGFP or pB7-MP^{MILBVV}D174A:eGFP, mixed with an *Agrobacterium* culture carrying pBin61-P19 ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2$). The number of fluorescence foci and cells in each focus were counted at 3 dpai by fluorescence microscopy. Four (GFP-gating) or three (NCAP) independent experiments were performed. Arcsine transformation was used to correct data for normal distribution. Comparisons among independent experiments for each protein analysed were done using one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, $\alpha = 0.05$).

4.7. Movement trans-complementation assay

N. benthamiana leaves were agroinfiltrated with diluted *Agrobacterium* cultures containing TMV Δ MP Δ CP-GFP ($OD_{600\text{ nm}} = 1.0 \times 10^{-5}$) and pBin61-P19 ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2$) together with *Agrobacterium* cultures for the expression of either the negative control mRFP ($OD_{600\text{ nm}} = 0.3$) or the positive controls (MP^{CPsV}:mRFP or MP^{MILBVV}:mRFP) ($OD_{600\text{ nm}} = 0.3$) in one half of the leaf, or together with *Agrobacterium* cultures carrying either MP^{CPsV}D141A:mRFP or MP^{MILBVV}D174A:mRFP ($OD_{600\text{ nm}} = 0.3$), on the other half. Infection foci were analysed at 4–7 dpai under UV illumination and CLSM. Four independent experiments were done using four leaves for each protein analysed.

Acknowledgments

EJP and MLG are recipients of research career awards from CONICET. MBB and GRL are fellows of CONICET. GRL and MLG belong to the staff of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. This work has been supported by grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) PICT 2010-1726, PIP 445 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) PIP 445, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) X692, and by Wellcome Trust grant 090005 to DK. We thank the three anonymous reviewers for their comments, in particular reviewer 3, who was hugely generous in his comments.

Appendix A. Supplementary material

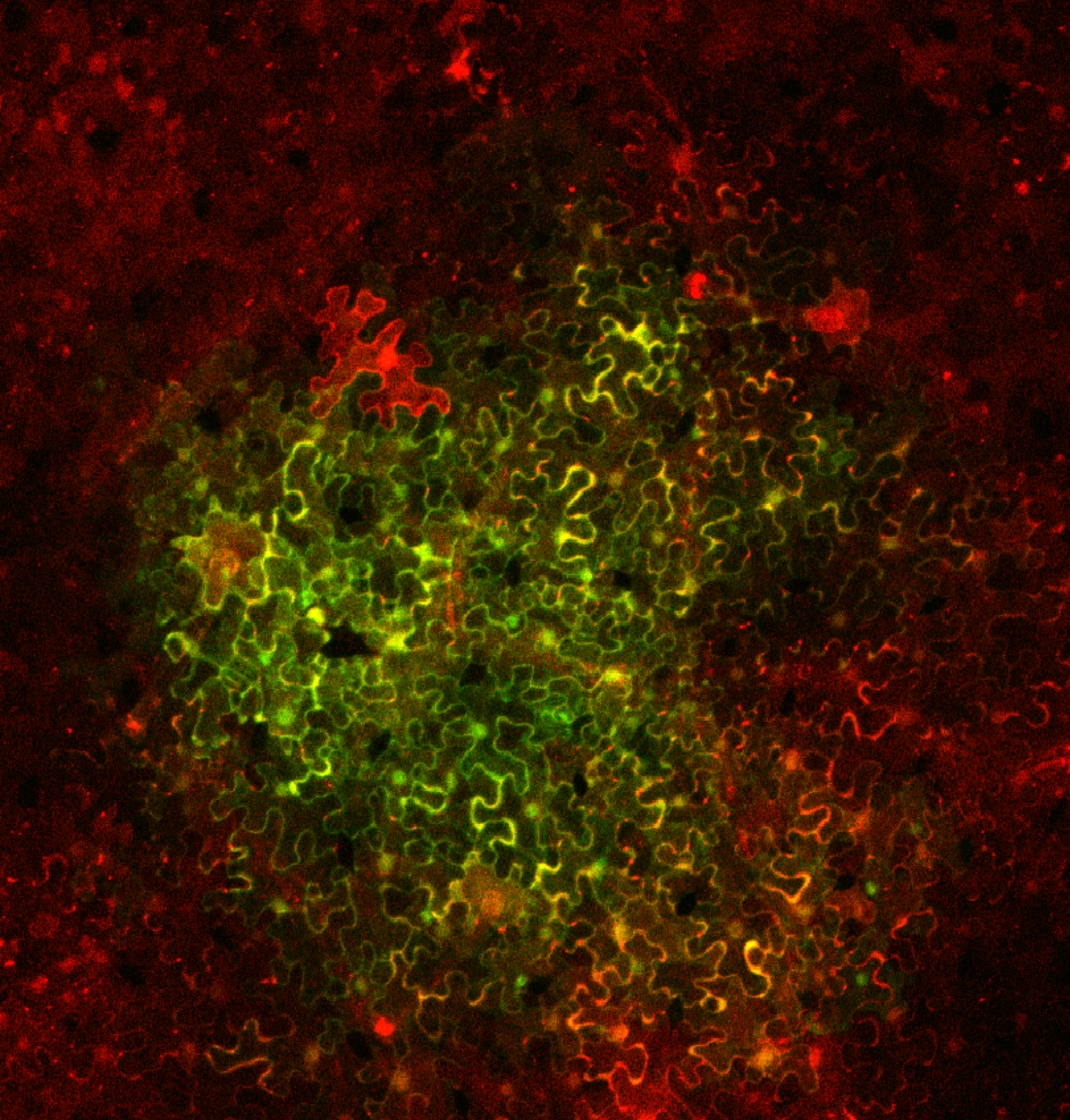
Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.027>.

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Bayne, E.H., Rakićina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D.C., 2005. Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44, 471–482.
- Bertens, P., Wellink, J., Goldbach, R., van Kammen, A., 2000. Mutational analysis of the cowpea mosaic virus movement protein. *Virology* 267, 199–208.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Soding, J., Lupas, A.N., 2006. The MPI bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, W335–W339.
- Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J., 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 36, W197–W201.
- Crawford, K.M., Zambryski, P.C., 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* 125, 1802–1812.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.M., Taly, J.F., Notredame, C., 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39, W13–W17.
- Ding, B., 1997. Cell-to-cell transport of macromolecules through plasmodesmata: a novel signalling pathway in plants. *Trends Cell Biol.* 7, 5–9.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N., Lucas, W.J., 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4, 915–928.
- Ferron, F., Longhi, S., Canard, B., Karlin, D., 2006. A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins* 65, 1–14.
- Finn, R.D., Cogill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279–D285.
- Goodin, M.M., Dietzgen, R.G., Schichnes, D., Ruzin, S., Jackson, A.O., 2002. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J.* 31, 375–383.
- Heinlein, M., 2015. Plasmodesmata: channels for viruses on the move. *Methods Mol. Biol.* 1217, 25–52.
- Heinlein, M., Epel, B.L., 2004. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* 235, 93–164.
- Hildebrand, A., Remmert, M., Biegert, A., Soding, J., 2009. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins* 77 (Suppl. 9), S128–S132.
- Hiraguri, A., Ueki, S., Kondo, H., Nomiyama, K., Shimizu, T., Ichiki-Uehara, T., Omura, T., Sasaki, N., Nunoya, H., Sasaya, T., 2013. Identification of a movement protein of Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus. *J. Gen. Virol.* 94, 1145–1150.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A., 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195.
- Karpova, O.V., Zayakina, O.V., Arkhipenko, M.V., Sheval, E.V., Kiselyova, O.I., Poljakov, V.Y., Yaminsky, I.V., Rodionova, N.P., Atabekov, J.G., 2006. Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary 'coat protein-RNA-movement protein' complexes. *J. Gen. Virol.* 87, 2731–2740.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Ryabov, E.V., Dolja, V.V., 1991. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 12), 2895–2903.
- Kozłowski, L.P., Bujnicki, J.M., 2012. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinform.* 13, 111.
- Kuchibhatla, D.B., Sherman, W.A., Chung, B.Y., Cook, S., Schneider, G., Eisenhaber, B., Karlin, D.G., 2014. Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently "orphan" viral proteins. *J. Virol.* 88, 10–20.
- Leisner, S.M., 1999. Molecular Basis of Virus Transport in Plants. In: Mandahar, C.L. (Ed.), *Molecular Biology of Plant Viruses*. Springer US, Boston: Kluwer, pp. 161–182.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Adkins, S., 2009. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390, 110–121.
- Lindbo, A., 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based over-expression vector. *Plant Physiol.* 145, 1232–1240.
- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J., Forster, R.L., 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 962–974.
- Lucas, W.J., 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169–184.
- Lucas, W.J., Ham, B.K., Kim, J.Y., 2009. Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19, 495–503.
- Mann, K.S., Beijerman, N., Johnson, K.N., Dietzgen, R.G., 2016. Cytrohabdovirus P3 genes encode 30K-like cell-to-cell movement proteins. *Virology* 489, 20–33.
- Melcher, U., 2000. The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* 81, 257–266.
- Moreno, P., Guerri, J., García, M.L., 2015. The psorosis disease of citrus: a pale light at the end of the tunnel. *J. Citrus Pathol.* 2 (1) (<http://escholarship.org/uc/item/0tn7m65m>).
- Morikawa, T., Nomura, Y., Yamamoto, T., Natsuaki, T., 1995. Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61, 578–581.
- Mushegian, A.R., Elena, S.F., 2015. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes.

- Virology 476, 304–315.
- Mushegian, A.R., Koonin, E.V., 1993. Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch. Virol.* 133, 239–257.
- Niehl, A., Heinlein, M., 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75–99.
- Ooi, H.S., Kwo, C.Y., Wildpaner, M., Sirota, F.L., Eisenhaber, B., Maurer-Stroh, S., Wong, W.C., Schleiffer, A., Eisenhaber, F., Schneider, G., 2009. ANNIE: integrated de novo protein sequence annotation. *Nucleic Acids Res.* 37, W435–W440.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., Epel, B., 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97, 743–754.
- Pei, J., Kim, B.H., Tang, M., Grishin, N.V., 2007. PROMALS web server for accurate multiple protein sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 35, W649–W652.
- Procter, J.B., Thompson, J., Letunic, I., Creevey, C., Jossinet, F., Barton, G.J., 2010. Visualization of multiple alignments, phylogenies and gene family evolution. *Nat. Methods* 7, S16–S25.
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., Soding, J., 2012. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9, 173–175.
- Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C., Oparka, K.J., 2001. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* 218, 31–44.
- Robles Luna, G., Pena, E.J., Borniego, M.B., Heinlein, M., Garcia, M.L., 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441, 152–161.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V., Milne, R.G., 2000. An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Arch. Virol.* 145, 2629–2642.
- Shemyakina, E.A., Solovyev, A.G., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Schiemann, J., Morozov, S.Y., 2011. The role of microtubule association in plasmodesmal targeting of potato mop-top virus movement protein TGBp1. *Open Virol. J.* 5, 1–11.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C., Yuan, M., 2010. Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* 22, 1373–1387.
- Taly, J.F., Magis, C., Bussotti, G., Chang, J.M., Di Tommaso, P., Erb, I., Espinosa-Carrasco, J., Kemena, C., Notredame, C., 2011. Using the T-Coffee package to build multiple sequence alignments of protein, RNA, DNA sequences and 3D structures. *Nat. Protoc.* 6, 1669–1682.
- Thekke-Veetil, T., Ho, T., Keller, K.E., Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., 2014. A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease. *Virus Res.* 189, 92–96.
- Torok, V.A., Vetten, H.J., 2010. Ophiovirus Associated with *Lettuce ring necrosis*. European Society for Virology Meeting. Cernobbio, Italy, p. 282.
- Vaira, A.M., García, M.L., Vetten, H.J., Navarro, J.A., Guerri, J., Hammond, J., Verbeek, M., Moreno, P., Natsuaki, T., Gago-Zachert, S., Morikawa, T., Torok, V., Pallás, V., 2011. Ophioviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy. IX Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Oxford (UK), pp. 743–748.
- Vaira, A.M., Hansen, M.A., Murphy, C., Reinsel, M.D., Hammond, J., 2009. First report of *Freesia sneek virus* in *Freesia* sp. in Virginia, USA. *Plant Dis.* 93, 965.
- Vaira, A.M., Milne, R.G., Accotto, G.P., Luisoni, E., Masenga, V., Lisa, V., 1997. Partial characterization of a new virus from ranunculus with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Arch. Virol.* 142, 2131–2146.
- Vogler, H., Kwon, M.O., Dang, V., Sambade, A., Fasler, M., Ashby, J., Heinlein, M., 2008. Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. *PLoS Pathog.* 4, e1000038.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–956.
- Wagmann, E., Zambryski, P., 1995. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 7, 2069–2079.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., Lucas, W.J., 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmal size exclusion limit. *Science* 246, 377–379.
- Yu, C., Karlin, D.G., Lu, Y., Wright, K., Chen, J., MacFarlane, S., 2013. Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J. Gen. Virol.* 94, 2117–2128.
- Zhang, Y., Zhang, C., Li, W., 2012. The nucleocapsid protein of an enveloped plant virus, Tomato spotted wilt virus, facilitates long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virus Res.* 163, 246–253.



M. BELÉN BORNIEGO - TESIS DOCTORAL 2017

CARACTERIZACIÓN MUTACIONAL Y FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO DE OPHIOVIRUS

DIRECTOR Dra. MARÍA LAURA GARCÍA

Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ciencias Exactas

